

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Brno, 2019

Ing. Michaela Čutová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**IZOLACE A ANALÝZA DNA SE ZAMĚŘENÍM NA
MIKROORGANISMY DŮLEŽITÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ**

DNA ISOLATION AND ANALYSIS FOCUSED ON MICROORGANISMS IMPORTANT IN FOOD PRODUCTION

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Michaela Čutová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií Akademický rok: 2018/19
Studentka: **Ing. Michaela Čutová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název dizertační práce:

Izolace a analýza DNA se zaměřením na mikroorganismy důležité v potravinářství

Zadání dizertační práce:

- Optimalizace přípravy buněčných lyzátů. Volba vhodného lyzačního činidla, jeho koncentrace, doba působení na buňky. Testování přísadků enzymů při přípravě buněčných lyzátů, jejich doba působení na buňky.
- Testování alternativních metod izolace nukleových kyselin z buněčných lyzátů
- Optimalizace reakčních podmínek izolace nukleových kyselin z buněčných lyzátů pomocí polymerních nosičů. Testování reakčních pufrů pro adsorpci nukleových kyselin na nosiče a elučních pufrů.
- Izolace nukleových kyselin z potravinových matric pomocí nosičů
- Studium sekundárních struktur nukleových kyselin pomocí bioinformatické analýzy u mikroorganismů využívaných v potravinářském průmyslu.

Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2019:

Ing. Michaela Čutová
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.9.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Identifikace bakteriální DNA se skládá z několika kroků: lyze buněk, izolace a purifikace DNA, precipitace ethanolem a identifikace bakteriálního kmene pomocí PCR, případně i jiných molekulárně biologických metod. Každý krok musí být optimalizován. Nukleové kyseliny lze z buněk izolovat pomocí magnetických nosičů. Molekuly DNA jsou na povrch magnetického nosiče navázány na základě elektrostatických interakcí a posléze jsou eluovány do pufru.

Cílem práce bude optimalizace jednotlivých kroků identifikace bakteriální DNA: buněčná lyze, izolace DNA, charakterizace pevných magnetických nosičů funkcionalizovaných aminoskupinami pro izolaci nukleových kyselin. Přítomnost DNA v eluátu bude ověřena pomocí gelové agarosové elektroforézy a množství eluované DNA bude stanoveno spektrofotometricky. Izolovaná DNA bude amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Dále je práce zaměřena na studium sekundárních struktur nukleových kyselin – křížových struktur a kvadruplexů. Tyto struktury se podílí na regulaci buněčných procesů jako např. exprese genů a jsou cílové struktury pro regulační proteiny. Byla provedena analýza genomu *in silico* u mikroorganismů významných v potravinářském průmyslu. Sekvence genomů mikroorganismů byly získány z databáze NCBI (National Center for Biotechnology). Pro analýzu byl použit software Palindrome Analyser a G4Hunter. Ve všech testovaných genomech bylo zjištěno zastoupení těchto lokálních struktur.

KLÍČOVÁ SLOVA

Magnetické částice

DNA

PCR

Invertované repetice

Kvadruplexy

ABSTRACT

Identification of bacterial DNA consists of several steps: cell lysis, isolation and purification of DNA, precipitation by ethanol, identification of bacterial strain by PCR or other molecular biology methods. Each step must be optimized. Nucleic acids can be isolated from cells by magnetic particles. The molecules of DNA are bound to the surface of magnetic carriers by electrostatic interaction, and then they are eluted into the buffer.

The aim of the work will be to optimize individual steps of identification of bacterial DNA: cell lysis, DNA isolation, characterization of solid magnetic carriers functionalized by amino groups for nucleic acid isolation. The presence of DNA will be verified using agarose gel electrophoresis and the amount of eluted DNA will be determined spectrophotometrically. Isolated DNA will be amplified by polymerase chain reaction (PCR).

Furthermore, the thesis focuses on the study of secondary structures of nucleic acids – cruciforms structures and quadruplexes. These structures are involved in the regulation of cellular processes like gene expression and target structures for regulatory proteins. *In silico* genome analysis was performed on important food industry microorganism genomes. The microorganism's genomic sequences were obtained from the NCBI (National Center for Biotechnology) database. The Palindrome Analyser and G4Hunter software were used for the analysis. Presence of these local structures were detected in all tested genomes.

KEY WORDS

Magnetic particles
DNA
PCR
Inverted repeats
Quadruplexes

Čutová, M.: Izolace a analýza DNA se zaměřením na mikroorganismy důležité v potravinářství. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 116 s. Vedoucí dizertační práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis doktoranda

Chtěla bych poděkovat panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. a panu doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při řešení a zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během studia.

OBSAH

Abstrakt	3
Klíčová slova	3
Abstract.....	4
Key words	4
Obsah.....	7
teoretická část	9
1. Úvod	9
1.1 Izolace nukleových kyselin.....	10
1.2 Magnetické částice	12
1.3 Imobilizace kovalentní vazbou.....	20
1.4 Nekovalentní interakce	22
1.5 Využití magnetických nosičů při izolaci DNA.....	22
1.6 Využití elektrostatických sil při reverzibilní adsorpci na magnetické nosiče	23
1.7 Adsorpce DNA na povrch silikagelu.....	24
1.8 Adsorpce kondenzované DNA	24
1.9 Amplifikační metoda – PCR.....	25
1.10 Agarosová gelová elektroforéza	26
1.11 Analýza výskytu invertovaných repetit a kvadruplexů v genomu.....	27
2. Cíl práce	30
Experimentální část	31
3. Materiál a metody.....	31
3.1 Kultivační média	31
3.2 Roztoky pro přípravu buněčných lyzátů	31
3.3 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA a reakční pufry	31
3.4 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu	34
3.5 Bakteriální kultury.....	35
3.6 DNA z kuřecích erythrocytů	35
3.7 Potravinové vzorky	35
3.8 Polymerní magnetické nosiče.....	36
3.9 Přístroje.....	37
3.10 Kultivace mikroorganismů rodu <i>Lactobacillus</i>	37
3.11 Příprava vzorků.....	38
3.12 Příprava buněčných lyzátů.....	38
3.13 Izolace nukleových kyselin	39
3.14 Spektrofotometrické měření a stanovení čistoty DNA.....	42
3.15 Polymerázová řetězová reakce	43
3.16 Detekce DNA a PCR pomocí agarosové gelové elektroforézy.....	44
3.17 Bioinformatická analýza.....	44
4. Výsledky.....	46

4.1	Příprava buněčných lyzátů.....	46
4.2	Izolace DNA z buněk bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> metodou vysolování.....	66
4.3	Optimalizace reakčních podmínek adsorpce a desorpce nukleových kyselin z P(HEMA-GMA)-NH ₂ nosičů.....	68
4.5	Izolace DNA z mléčných výrobků	72
4.6	Bioinformatická analýza DNA mikroorganismů využívaných v potravinářském průmyslu.....	78
	Diskuze	88
	Závěr	93
	Seznam zkratk.....	95
	Seznam použité literatury	97
	Stručný životopis autorky	112
	Přehled publikační činnosti, konferenčních příspěvků a projektů.....	114
	Seznam příloh	116

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

V potravinářském průmyslu je pro praktické využití důležitá identifikace kmenů, tj. jejich přiřazení do stávajících taxonů. Moderní bakteriální taxonomie využívá analýzy makromolekul, zejména DNA. Identifikace bakteriální DNA se skládá z několika kroků: lyze buněk, izolace a purifikace DNA, precipitace ethanolem (*Sambrook a Russel, 2001*) a identifikace bakteriálního kmene pomocí PCR, případně i jiných molekulárně biologických metod. Každý tento krok musí být optimalizován. Pro efektivní výzkum je nutné zvolit metody rychlé, šetrné a účinné.

Prvním krokem při identifikaci bakterií je buněčná lyze. Enzymy způsobující lyzi buněčné stěny jsou cenné nástroje pro biotechnology, využívají se i v lékařství, potravinářském průmyslu a zemědělství pro získání intracelulárních produktů z kvasinek nebo bakterií (*Salazar a Asenjo, 2007*). Byla popsána celá řada protokolů přípravy buněčných lyzátů bakterií, včetně chemických, enzymatických a mechanických metod nebo jejich kombinace (*De Bruin a spol., 2019*).

Na základě struktury buněčné stěny jsou bakterie rozděleny na Gram-pozitivní a Gram-negativní. Buněčná stěna se skládá z peptidoglykanů, jejichž chemické složení a struktura je podobná u obou typů bakterií (*Salazar a Asenjo, 2007*). Avšak u Gram-negativních bakterií je peptidoglykanová vrstva mnohem tenčí (*Salazar a Asenjo, 2007*). Polymer tvořící buněčnou stěnu je tvořen N-acetyl-D-glukosaminovými jednotkami připojenými $\beta(1-4)$ vazbou na N-acetylmuramovou kyselinu a je zodpovědný za sílu buněčné stěny (*Koch, 1998*). V peptidoglykanových vrstvách se u Gram-pozitivních bakterií vyskytují aminokyseliny a aminokyselinové deriváty, které tvoří glykan-tetrapeptid, který se mnohokrát opakuje v buněčné stěně (*Salazar a Asenjo, 2007*). Tetrapeptidy sousedních polymerů jsou spojeny penta-glycinovými můstky polymerů a směrem k vnější straně je peptidoglykan spojen s kyselinou teichovou a polysacharidy (*Salazar a Asenjo, 2007*).

Pro uvolnění DNA z buněk je nutné provést disrupci buněčné stěny a cytoplazmatické membrány. Enzymy, které štěpí peptidoglykany bakterií, tvořící buněčnou stěnu, jsou souhrnně nazývané mureinové hydrolázy (*Salazar a Asenjo, 2007*). Nejznámějším lytickým enzymem je lysozym, který se vyrábí převážně ze slepičího vaječného bílku (*Salazar a Asenjo, 2007*). Rozsáhlá hydrolýza peptidoglykanu lysozymem vede k buněčné lyzi a smrti při změně osmotického prostředí (*Salazar a Asenjo, 2007*).

Silné nebo jinak obtížně rozrušitelné bakterie obvykle vyžadují mechanickou lyzi (*Vandeventer a spol. 2011*). Gram-negativní bakterie mají dvouvrstvou buněčnou stěnu s periplazmatickým prostorem (*Salazar a Asenjo, 2007*). Vnější membrána (složená z proteinů, fosfolipidů, lipoproteinů a lipopolysacharidů a vnitřní tuhé peptidoglykanové vrstvy) zabraňuje přístupu lytickým enzymům (*Salazar a Asenjo, 2007*).

Po buněčné lyzi následuje separace nukleových kyselin z buněčných lyzátů. Jedním ze způsobu izolace DNA je využití magnetických nosičů. Magnetické separační techniky se uplatňují od počátku 70. let zejména v oblastech biotechnologie, v molekulární diagnostice a mikrobiologii. Z těchto odvětví se přenesla i do lékařství (*Zhang a spol., 2015*) pro diagnostiku geneticky podmíněných onemocnění (*Horák a spol., 2007*).

Magnetické nosiče lze využít v následujících aplikacích:

- Imunomagnetické separace bakteriálních buněk
- Buněčná separace (separace cílových buněk z heterogenního prostředí)
- Izolace a purifikace DNA/RNA v molekulární diagnostice
- Imobilizace enzymů a jejich následné využití
- Izolace protilátek a antigenů
- DNA-DNA hybridizace
- Biosenzory
- Přenos genů

Magnetické nosiče se využívají k izolaci buněčných organel, biologicky aktivních molekul (proteinů a nukleových kyselin) i samotných buněk (prokaryotické i eukaryotické) (*Dynal, 1995; Li a spol., 2007; Melzak a spol., 1996*). Dále se využívají k separaci nebo čištění chemických látek. Magnetické částice mohou být využity jako nosiče enzymů, které plní katalytickou funkci ve vsádkových systémech nebo mikroreaktorech.

Magnetické nosiče, využívané pro izolaci cílových molekul, jsou malé kuličky, jejichž rozměry se pohybují v nano až mikrometrech (*Horák a spol., 2007*). Vnitřní část nosiče je tvořena magnetickým jádrem, které je zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem (*Lu a spol., 2007*). Magnetické jádro je obaleno polymerním povrchem, na kterém je ukotven ligand, který zodpovídá za navázání cílové molekuly. Aby byla magnetická separace účinná, je nutné najít rovnováhu mezi velikostí aktivního povrchu a jeho magnetickými vlastnostmi (*Horák a spol., 2007*). Dalším důležitým aspektem je zajistit optimální prostředí, ve kterém dochází k separaci cílových molekul.

1.1 Izolace nukleových kyselin

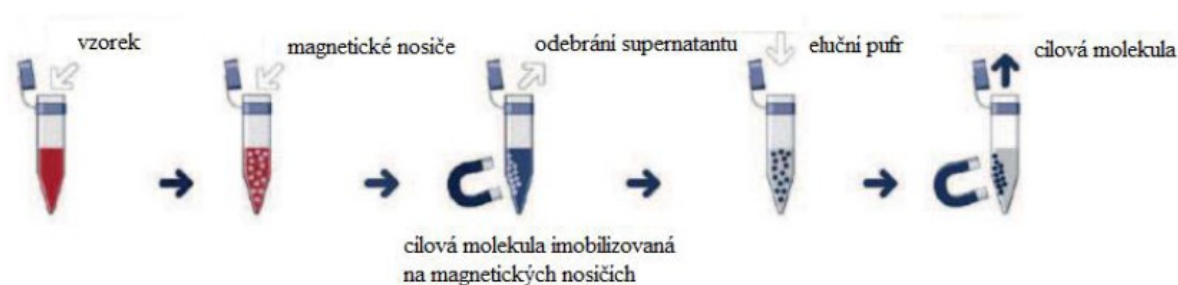
Nukleové kyseliny se izolují z biologického materiálu. Izolaci předchází rozrušení buněčných struktur (buněčných stěn). Nukleové kyseliny se extrahují do vodných roztoků pufru. K pufrům jsou přidávány tenzidy, které uvolňují nukleové kyseliny z vazby s bílkovinami, a také inhibitory enzymů, které zabraňují štěpení nukleových kyselin. Z extraktu lze nukleové kyseliny vysrážet přidáním ethanolu (propanolu a octanu amonného). Nejběžnějším postupem izolace DNA je fenol-chloroformová extrakce. (*Sambrook a Russel, 2001*) V uvedeném postupu se používají toxické organické látky. Dalším způsobem izolace DNA je alkalická lyze v kombinaci s SDS (dodecylsírán sodný). Působením silného detergentu při vyšším pH dochází k otevření buněčné stěny a DNA je uvolněna

do supernatantu (*Sambrook a Russel, 2001*). Metoda izolace DNA vysolováním je alternativou ke dříve zmíněným metodám. Dosažené výsledky jsou srovnatelné s metodou fenol-chloroformové extrakce. Jednou z možností izolace nukleových kyselin je použití magnetických nosičů. Je to metoda velmi šetrná k životnímu prostředí.

1.1.1 Magnetické separační metody

Principem magnetických technik je působení magnetického pole na magnetické nano/mikročástice, které jsou suspendované v pufru či destilované vodě. Magnetické nosiče používané při izolaci DNA jsou zpravidla superparamagnetické. Magnetické vlastnosti částic se projevují pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Bez přítomnosti vnějšího magnetického pole částice neagregují. Pro separaci magnetických částic od vzorku je nutné použít magnetický separátor. Na magnetických nosičích mohou být navázány ligandy afinitní k cílovým molekulám.

Separace a izolace cílové molekuly probíhá v několika krocích (*Berensmeier, 2006*). Postup je uveden na *Obrázku 1*.



Obrázek 1: Princip magnetické separace a izolace cílové molekuly z buněčných lyzátů (vzorek) (Berensmeier, 2006)

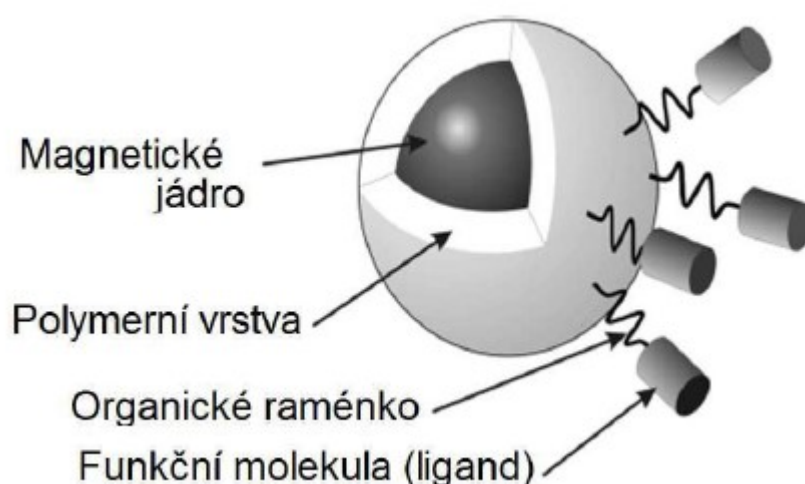
Tyto separační techniky lze použít i ve složitějších biologických systémech: buněčné suspenze, buněčné lyzáty, fermentační média, komplexní reálné vzorky apod (*Pečová a spol., 2011*). Magnetické metody jsou moderní alternativou separačních a purifikačních postupů. Uvedené metody jsou rychlejší, jednodušší, efektivnější a cenově dostupnější oproti jiným běžně využívaným technikám. Další výhodou je vysoká výtěžnost a čistota cílové molekuly (*Rittich a spol., 2007*). Získaná DNA může být použita jako matrice do polymerázové řetězové reakce (PCR) pro identifikaci bakteriálního druhu. Klíčovým faktorem pro zajištění úspěšného provedení PCR je vysoce kvalitní DNA. Proto je vývoj metod extrakce DNA velmi důležitý (*Jiang a spol., 2012*). Při manipulaci s magnetickými nosiči odpadá práce s organickými toxickými látkami. Postupy založené na magnetické separaci izolovaných látek nachází uplatnění v široké oblasti biologického výzkumu (molekulární biologie, biochemie,

buněčná biologie, imunologie), v medicíně, v biotechnologiích (potravinářství), v analytických metodách a environmentálních technologiích (Aguilar-Artega a spol., 2010b). V potravinářském průmyslu se nosiče využívají pro imunomagnetické separace (IMS) patogenních bakterií v potravinách (Rotariu a spol., 2003). Tyto metody jsou vhodné jako pro laboratorní práci, tak pro výrobní praxi (Horák a spol., 2007).

Magnetické techniky se využívají i při dekontaminaci, např. čištění odpadních vod (Aguilar-Artega a spol., 2010b). Magnetit (Fe_3O_4) vykazuje ionexové vlastnosti. V kyselém prostředí nese kladný náboj, zatímco nečistoty ve vodném prostředí nesou náboj záporný. K separaci dochází v bubnových magnetických separátorech (Šafaříková a spol., 1995). Výhodou oproti centrifugaci, filtraci nebo extrakci je rychlost separace, a proto je tato metoda využívána v oblasti životního prostředí, potravinářství, lékařství a biotechnologie (Aguilar-Artega a spol., 2010b).

1.2 Magnetické částice

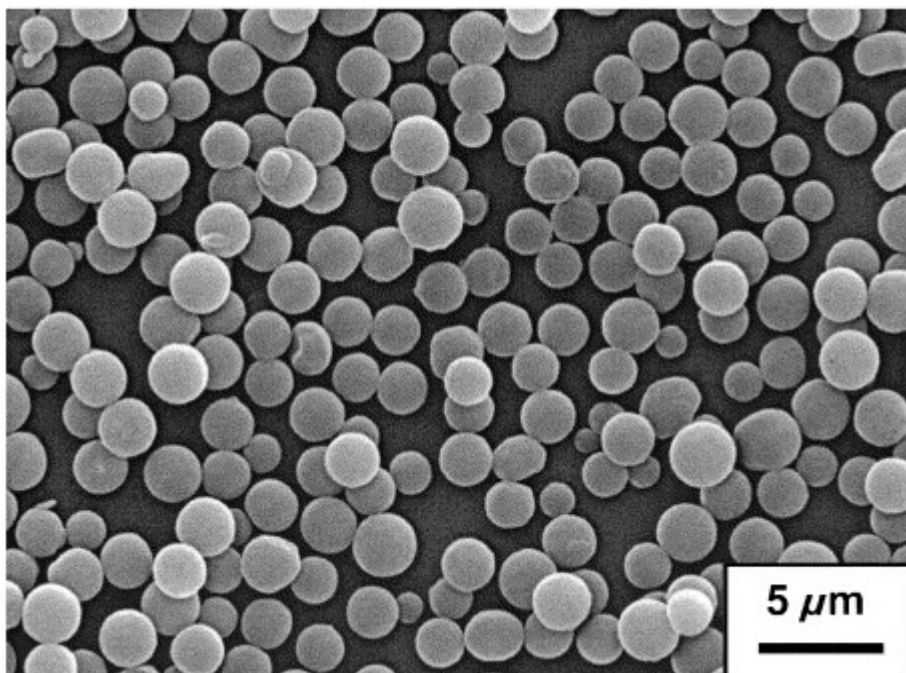
Základem částice je anorganické magnetické jádro, které je nositelem magnetických vlastností (Horák a spol., 2007, Lu a spol., 2007). Magnetické vlastnosti jádra závisí na obsahu magnetického plniva, hmotnosti a koncentraci magnetického materiálu a distribuci uvnitř materiálu (Horák a spol., 2004). Obal jádra tvoří nemagnetická vrstva, která se skládá z organického materiálu - polymeru. Funkcí obalu je ochrana jádra před přímým kontaktem s analytem a nespecifickými interakcemi. Na povrch částice mohou být navázány funkční skupiny sloužící k imobilizaci cílových molekul (Obrázek 2) (Horák a spol., 2004; McBain a spol., 2008).



Obrázek 2: Stavba magnetické částice (Upraveno dle McBain a spol., 2008)

Důležitou vlastností magnetického nosiče je stabilita v různých prostředích (odolnost vůči chemickým přeměnám) a biokompatibilita. V závislosti na obsahu magnetického plniva je dána rychlost separace v magnetickém poli (Šálek, 2010). Magnetické částice by neměly agregovat. Větší specifický povrch poskytuje větší prostor pro možné interakce s cílovými molekulami, tzn. účinnost separace je přímo úměrná velikosti povrchu (Šafařík a spol., 2004). Velmi významným a nezanedbatelným parametrem při použití nano/mikročásteček je jejich monodisperzita, tj. jednotná velikost. Monodisperzní částice vykazují jednotné fyzikální a chemické vlastnosti (Horák a spol., 2004). Pro praktické aplikace magnetických nosičů z hlediska hydrodynamických vlastností je nejvhodnější pravidelný sférický kulový tvar. (Obrázek 3) Částice s nepravidelným tvarem jsou mnohem náchylnější k mechanickému poškození a rozlomení oproti kulovým částicím. (Šafařík a spol., 2004) Důležitou roli hraje i velikost nosiče. Pokud se jedná o nanočástice, pohybuje se jejich velikost v rozmezí 10–200 nm. Jako mikročástice jsou označovány větší nosiče a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 10–300 μm (Horák a spol., 2007; McBain a spol., 2008). Velikost částic určuje také magnetický materiál, který tvoří magnetické jádro, a metoda syntézy částice (Horák a spol., 2007; Ma a spol., 2007).

Jako výhodnější jsou považovány částice s co nejmenším průměrem, neboť mají velký specifický povrch, který může být lépe využit k připojení různých ligandů (Šafařík a spol., 2004). Na druhou stranu malé částice přestávají být citlivé na působení vnějšího magnetického pole, neboť je zde velmi malé množství magnetického plnidla (McBain a spol., 2008; Trachtová, 2011). U velkých částic je specifický povrch menší a další nevýhodou je, že dochází k snadné sedimentaci. Nevzniká tak dostatečný prostor pro tvorbu kvazihomogenního prostředí, a tím se snižuje prostor pro kontakt nosiče se vzorkem (Aguilar-Arteaga a spol., 2010). V praxi to znamená, že musí být nalezen kompromis mezi velikostí aktivního povrchu částic a jejich magnetickými vlastnostmi (Horák a spol., 2007, Lu a spol. 2007).



Obrázek 3: Elektronové mikrosnímky ukazují kulovitý tvar magnetických nanonosičů *P(HEMA-co-GMA)* (Španová a spol., 2004)

Existuje mnoho typů metod syntéz magnetických nosičů. Důležité jsou podmínky syntézy (reakční teplota a doba, koncentrace reaktantů, typ a množství katalytů, kvalita rozpouštědla), které udávají kvalitu magnetických nosičů (Ji a spol., 2009).

1.2.1 Magnetické jádro

Magnetické jádro se superparamagnetickými vlastnostmi musí vykazovat paramagnetické vlastnosti, tzn. že magnetizuje pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Při odstranění magnetického pole vlastnosti ztrácí, přičemž nevykazuje zbytkový magnetismus, a tudíž nedochází k shlukování částic (Horák a spol., 2004). Jádro částice je tvořeno magnetickým materiálem. Nejběžnější materiál pro přípravu jádra je magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), nebo je jádro tvořeno čistými kovy (železo) a jejich slitinami (CoPt_3 , FePt , MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4) (Horák a spol., 2004; Hribernik a spol., 2012; Aguilar-Arteaga a spol., 2010a; Lu a spol., 2007). Sloučeniny jiných prvků (Cr, Ni, Co), které rovněž vykazují magnetické vlastnosti, nelze použít pro biologické aplikace z důvodů jejich toxicity (Horák a spol., 2004; Ma a spol., 2006). Superparamagnetické nanočástice se rozdělují na jednodoménové a multidoménové. V jednodoménových částicích jsou magnetické momenty uspořádány paralelně, přičemž výsledný vektor je vyšší než u multidoménových. Proto se v poslední době využívají spíše jednodoménové nanočástice, zejména pro jejich efektivní, rychlou a účinnou imobilizaci cílových molekul (Pečová a spol., 2011).

Existuje řada metod přípravy magnetických nosičů. Jednotlivé metody se rozlišují v závislosti na množství magnetického materiálu enkapsulovaného do polymeru, velikosti a polydispersity nosičů (Lu, 2007). Při výběru nosiče je důležité brát v úvahu, pro jaké účely budou magnetické nosiče využity. Například sloučeniny kobaltu jsou toxické, a proto je jeho využití v biomedicině vyloučené (Horák a spol., 2004; Hribernik a spol., 2012). Tabulka 1 ukazuje přehled využívaných technik pro syntézu magnetických jader.

Tabulka 1: Přehled metod syntéz magnetických jader (Upraveno dle Lu, 2007)

Technika syntézy	Vlastnosti syntézy	Reakční teplota [°C]	Reakční perioda	Rozpouštědlo	Kontrola tvaru	Výnos
Spolusrážení	velmi jednoduchá	20–90	minuty	voda	špatná	vysoký
Tepelný rozklad	komplikovaná inertní atmosféra	100–320	hodiny/dny	organické sloučeniny	velmi dobrá	vysoký
Mikroemulze	komplikovaná	20–50	hodiny	organické sloučeniny	dobrá	nízký
Hydrotermální syntéza	jednoduchá, vysoký tlak	220	hodiny/dny	voda-ethanol	velmi dobrá	střední

Mezi metody syntézy magnetických jader magnetických nosičů, které se využívají pro bioaplikace, jsou řazeny chemické reakce srážení solí železa, termický rozklad prekurzorů obsahujících železo, mikroemulzní techniky, sonochemické syntézy aj. (Matsunanga a spol., 2004). Nejběžněji je využívána metoda spolusrážení pro přípravu magnetitu (Fe_3O_4) a maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Hribernik a spol., 2012). Magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) lze připravit dvěma způsoby (Horák a spol., 2007). V prvním případě je roztok hydroxidu železnatého oxidován různými oxidačními činidly (Sugimoto, 1980).

V druhém případě dochází ke koprecipitaci iontů Fe^{2+} a Fe^{3+} z roztoků solí za přídavku báze (Khalafalla a spol., 1980). Touto metodou vznikají většinou částice o různé velikosti. Velikost, tvar a složení magnetických nanočástic závisí na použité soli (např. chloridy, sulfáty, nitráty), na poměru $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, reakční teplotě, pH a iontové síle médií (Lu a spol., 2007; Hribernik a spol., 2012; Laurent a spol., 2008). Přídavkem chelatujících organických aniontů (např. kyseliny citronové nebo olejové) nebo polymerů jako je dextran, škrob či polyvinylalkohol dochází k oxidaci magnetitu na maghemit a tím je dosaženo monodisperzity syntetizovaných nanonosičů (Šafařík a spol., 1999; Lu a spol., 2007). Magnetická jádra nosičů lze připravit i tepelným rozkladem organokovových sloučenin obsahujících železo. Tato reakce probíhá za zvýšených teplot v organických rozpouštědlech.

Další možností iniciace tepelného rozkladu je použití ultrazvuku. Výhodou metody je možnost ovlivnění velikosti a tvaru částic. Další využívanou technikou pro syntézu magnetického jádra je mikroemulzní metoda. Tato metoda je založena na tvorbě micel

ve dvou nemísitelných kapalinách (olej/voda), které obklopují magnetické nosiče (*Hribernik a spol., 2012; Laurent a spol., 2008*). Velikost vzniklých nanočástic může být řízena úpravou velikosti nitra micely pomocí vodné fáze (*Hribernik a spol., 2012; Laurent a spol., 2008*). Málo využívanou technikou je hydrotermální syntéza, i když syntetizuje vysoce kvalitní nanočástice (*Lu a spol., 2007; Hribernik a spol., 2012*).

1.2.2 Pokrytí částic

Důležitým aspektem je ochrana magnetického jádra před vnějším prostředím, aby jádro nepodléhalo oxidaci a bylo chemicky stabilní. Dalším požadavkem na magnetické nosiče je, aby nedocházelo k jejich aglomeraci a nedocházelo k nežádoucím reakcím s okolím. Jako nejjednodušší způsob se jeví metoda tvorby ochranné vrstvy na povrchu „nahého“ magnetického jádra, čímž dojde k izolaci jádra od prostředí (*Macková a spol., 2007*).

Použité metody lze rozdělit do dvou skupin, kdy povrchová vrstva je tvořena:

- a) organickým materiálem (povrchově aktivními látkami a polymery) (*Laurent a spol., 2008*)
- b) anorganického materiálem (oxid křemičitý, uhlík, nebo drahé kovy jako Ag, Au) (*Laurent a spol., 2008*)

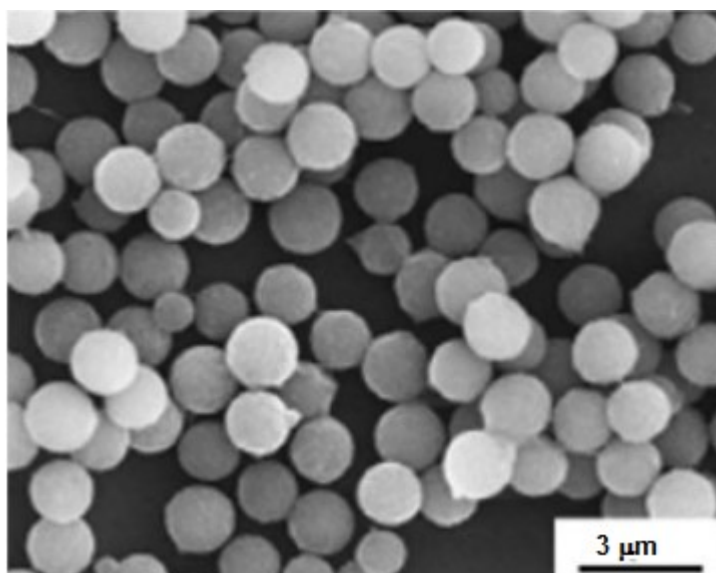
1.2.2.1 Pokrytí částic polymery

Pro tvorbu obalové vrstvy se často používají povrchově aktivní látky nebo vhodné nízko/vysokomolekulární polymery. Na částici jsou adsorbované povrchově aktivní látky a polymery, nebo jsou chemicky ukotvené v jedné či dvou vrstvách. Polymery, které obsahují funkční skupiny (karboxylové kyseliny, fosfáty či sulfáty) se vážou na povrch magnetitu (*Lu a spol., 2007*). Vnější vrstva je nejčastěji tvořena organickými látkami přírodního typu (hyaluronová, pektinová nebo alginová kyselina) (*Šafaříková a spol., 2003*), dextranem (*Liu a spol., 2011; Lu a spol., 2007*) či syntetického původu (polymethylmethakrylát, polyethylenglykol) (*Horák a spol., 2007*). Nevýhodou přírodních materiálů je nízká mechanická pevnost (*Laurent a spol., 2008; Horák a spol., 2001; Lenfeld, 1993*). Výhodou přírodních materiálů je biokompatibilita, biologická degradace na netoxické produkty, hydrofobicita, antimikrobní vlastnosti, schopnost tvorby gelu a afinita k proteinům. Tyto vlastnosti vykazuje např. chitin a chitosan (*Jiang a spol., 2012; Šafařík a spol., 1993*). Dříve se pro tvorbu obalu magnetického nosiče využíval polystyren (PS) nebo poly(methylmetakrylát) (PMMA). Nevýhodou těchto polymerů je jejich hydrofóbnost a složitá povrchová úprava (*Horák a spol., 2007*). Proto se dnes využívají spíše materiály na bázi poly(glycidylmethakrylátu) (PGMA) a poly(2-hydroxyethylmethakrylátu) (P(HEMA)). Takto připravené magnetické nosiče za použití (P(HEMA)) jsou netoxické a biokompatibilní, a proto jsou vhodné i pro biolékařské aplikace. Nosiče jsou hydrofilní, mechanicky stabilní, inertní a nerozpustné ve vodě (*Horák a spol., 2005*). Pro speciální účely (nanomedicína) je na povrchu nosiče vytvořen obal z přírodního materiálu, který je

biodegradovatelný. Obalová vrstva připravených magnetických jader tvořená polymerní matricí je nejčastěji vytvořena heterogenními polymerizačními technikami – suspenzní, emulzní či disperzní polymerací. Každý systém monomerů vždy vyžaduje nalezení optimálních podmínek polymerace. Nejstarší metodou využívanou pro tvorbu obalu je metoda suspenzní polymerace (Horák a spol., 2007; Trachtová, 2011; Macková a spol., 2007). Nosiče připraveny tímto způsobem jsou však polydisperzní.

Druhou metodou zapouzdření magnetických jader je metoda emulzní polymerace, která se využívá nejčastěji (Horák a spol. 2003). Výsledkem této techniky jsou částice stejné velikosti s vysokou průměrnou molární hmotností. Reakční rychlost polymerace je značně vysoká.

Poslední využívanou technikou pro obalování magnetických jader je disperzní polymerace. Produktem jsou monodisperzní, neporézní mikročástice sférického tvaru (Horák a spol., 2007; Laurent a spol., 2008) (Obrázek 4).



Obrázek 4: Elektronové mikrosnímky magnetických nanočástic P(HEMA-co-EDMA) (Křížová a spol., 2005)

1.2.2.2 Pokrytí částic anorganickými materiály

Drahé kovy jsou na povrch nosiče aplikovány nejčastěji metodou mikroemulzních reakcí. Nízkou reaktivitu a vysokou stabilitu vykazuje především zlato (Maeda a spol., 2008). Nanočástice jsou složeny z Fe_3O_4 jádra se zlatým pláštěm (Tarmer a spol., 2011). Charakter spodní vrstvy se odlišuje od zlatého obalu, proto jsou tyto aplikace obtížné. Výhodou pozlacení částic je velice snadná funkcionalizace thiolovými skupinami (Lu a spol., 2007).

Tyčinkové pozlacené nanočástice železa mají průměr 16 ± 2 nm a průměrnou délkou asi 50 ± 5 nm (Tarmer a spol., 2011). Monodisperzní Au- Fe_3O_4 nanočástice byly připraveny vstříkáváním prekursoru (HAuCl_4) do horkého reakčního roztoku. Velikost Au- Fe_3O_4 částic

může být řízena změnou vstřikovací teploty. Stejnou metodou syntézy nanočástic byly připraveny Ag-Fe₃O₄ částice, kdy prekurzorem byl AgNO₃ (Hao a spol., 2010). Pozlacené magnetické částice se využívají pro imunologické reakce. Povrch pozlacených magnetických nanočástic byl modifikován lidským imunoglobulinem (IgG). Pro detekci imunologické reakce byl vyvinut imunosensor, který zaznamenává interakci protilátky s bílkovinou z bakterie *Staphylococcus aureus* (Pham a spol., 2010). Dalším anorganickým zástupcem využívaným pro tvorbu obalové vrstvy je oxid křemičitý (Lu a spol., 2007). Přednosti oxidu křemičitého jsou jeho stabilita ve vodném prostředí, snadná povrchová úprava a tím i zamezení nežádoucích interakcí. Jedná se o amorfni materiál charakteristický vysokou mechanickou pevností (Horák a spol., 2007; Laurent a spol., 2008). Hydrofilní povrch lze snadno pokrýt dalšími funkčními skupinami. Silikagelové povrchy nesou záporný náboj, a proto jsou nosiče s tímto nábojem uchovávány ve vodě bez přidání dalších povrchově aktivních látek. Opouzdření jádra oxidem křemičitým může být provedeno Stöberovou metodou, v procesu sol-gel (transformaci koloidní suspenze na gel) nebo přímo při hydrolýze tetraethoxysilanu (TEOS) (Lu a spol., 2007; Gupta a spol., 2005). Mezi hlavní výhody silikagelových nanočástic je přesnější dávkování nosičů a vysoká reprodukovatelnost izolace DNA (Trachtová a spol., 2011).

V poslední době se využívají magnetické nosiče s grafitovým povrchem. Uhlík vykazuje řadu pozitivních vlastností jako je vyšší chemická a tepelná stabilita, biokompatibilita, bariéra proti oxidaci a kyselé erozi. Nevýhodou těchto nosičů je jejich polydisperzita (Lu a spol., 2007).

1.2.3 Funkcionalizace povrchu magnetických částic

Na stabilizované magnetické nosiče lze imobilizovat vysokomolekulární i nízkomolekulární ligandy. Vhodně funkcionalizované magnetické částice slouží jako nosiče protilátek, biologicky významných proteinů a peptidů, enzymů, oligonukleotidů, nukleových kyselin, hormonů, léčiv, buněk, diagnostických látek, nízkomolekulárních látek (kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina iminodioctová (IDA)) a celé řady jiných látek (Pečová a spol., 2011; Křížová a spol., 2004; Aguilar-Arteaga a spol., 2010a). Ligandem mohou být i pouhé funkční skupiny: aminy, karboxylové kyseliny, aldehydy, thioly, epoxyoly, hydroxyoly, protein, alkylové řetězce apod. (Aguilar-Arteaga a spol., 2010a). Ligandy jsou voleny dle požadované aplikace.

Důležitý je sférický tvar částice, který poskytuje dostatečný prostor pro navázání ligandu na povrch nosiče i volný přístup cílové molekuly k ligandu. Pokud je cílová molekula či ligand objemný a docházelo by k vzájemnému utlačování sousedních molekul lze využít tzv. orientovanou imobilizaci, nebo použít mezerník neboli raménka (tzv. spacer arm) (Horák a spol., 2007). Mezerníky jsou krátké lineární uhlovodíky na konci zakončené funkčními skupinami, kterými jsou ukotveny na nosič. Na druhém konci mezerníků jsou skupiny, které se vážou na ligand (Horák a spol., 2007). Při povrchových úpravách může dojít ke snížení magnetických vlastností (Lu a spol., 2007). Charakteristikou vhodného a funkčního magnetického nosiče je biokompatibilita, potlačení mezičásticových interakcí a možnost

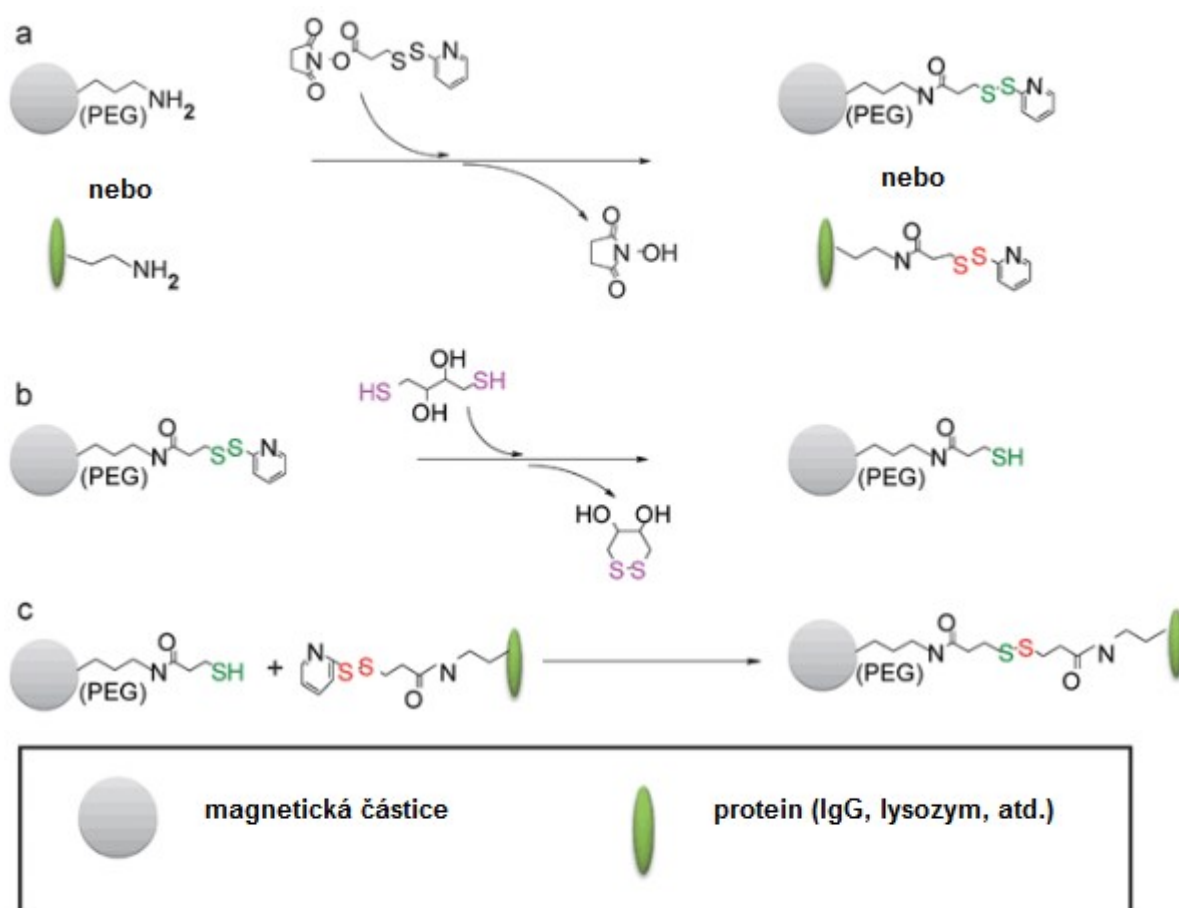
chemické modifikace nezbytné pro následnou imobilizaci biomolekul (*Pečová a spol., 2011*). Vhodnost nosiče pro cílové molekuly je posuzována s ohledem na imobilizovaný ligand. Afinita izolované látky k ligandu je vyjádřena afinitní konstantou K , kdy rozmezí této konstanty se pohybuje $K = 10^{-4}$ – 10^{-8} mol·l⁻¹. Ligand je na povrch nosiče navázán pomocí vhodné funkční skupiny (*Křížová a spol., 2004*). Hlavními aspekty pro tvorbu imobilizovaných systémů jsou: volba matrice nosiče, výběr afinitního ligandu a způsob imobilizace ligandu na nosič.

Další funkcí magnetického nosiče je, kromě izolace cílových molekul, působení aktivity samotného ligandu (*Kenawy a spol., 1998*). Významnou skupinou látek imobilizovaných na nosiči, které uplatňují svou aktivitu, jsou enzymy (proteasy – trypsin, chymotrypsin, keratinasa, lipasy, amylolytické enzymy a oxidoreduktasy - laktasa) (*Pečová a spol., 2011*). Ligandy mohou plnit i funkci modifikace cílových molekul (*Kenawy a spol., 1998*). Imobilizací enzymů na magnetické částice je dosaženo vyšší stability enzymu, posunutí limitů optimálních podmínek (teplota, pH) a snadné manipulace. Další výhodou je zvýšení afinity enzym substrát (snížení K_m – Michaelisovy konstanty) a možnosti opakovaného použití imobilizovaného enzymu (*Cao a spol., 2005*).

Existují dvě techniky imobilizace ligandů na povrch magnetického nosiče. Prvním typem imobilizace je ukotvení pomocí chemické vazby (kovalentní vazba). Imobilizovat lze i pomocí fyzikálních metod (vazby elektrostatické, hydrofobní/hydrofilní, iontové a vodíkové) (*Pečová a spol., 2011*). Ligandy mohou být i zabudovány přímo do gelové matrice magnetické částice. Matrice se skládá nejčastěji ze syntetických polymerů (polyakrylamid, polyurethan), pryskyřic, proteinů (vaječný bílek, želatina, kolagen) a polysacharidů (karageny, algináty, agar, agarosa). Výhodou těchto materiálů je, že jsou netoxické, biokompatibilní, proto mohou být využívány v nejrůznějších odvětvích. Do gelových matic mohou být zabudovány nejen biologicky aktivní látky, ale i celé buňky. Imobilizovaný protein si zachovává veškeré biologické funkce, neboť poskytované podmínky jsou velice podobné fyziologickým a nedochází pak k denaturaci proteinu (*Pečová a spol., 2011*). Nevýhodou postupu může být postupné uvolňování imobilizované látky (*Pečová a spol., 2011*).

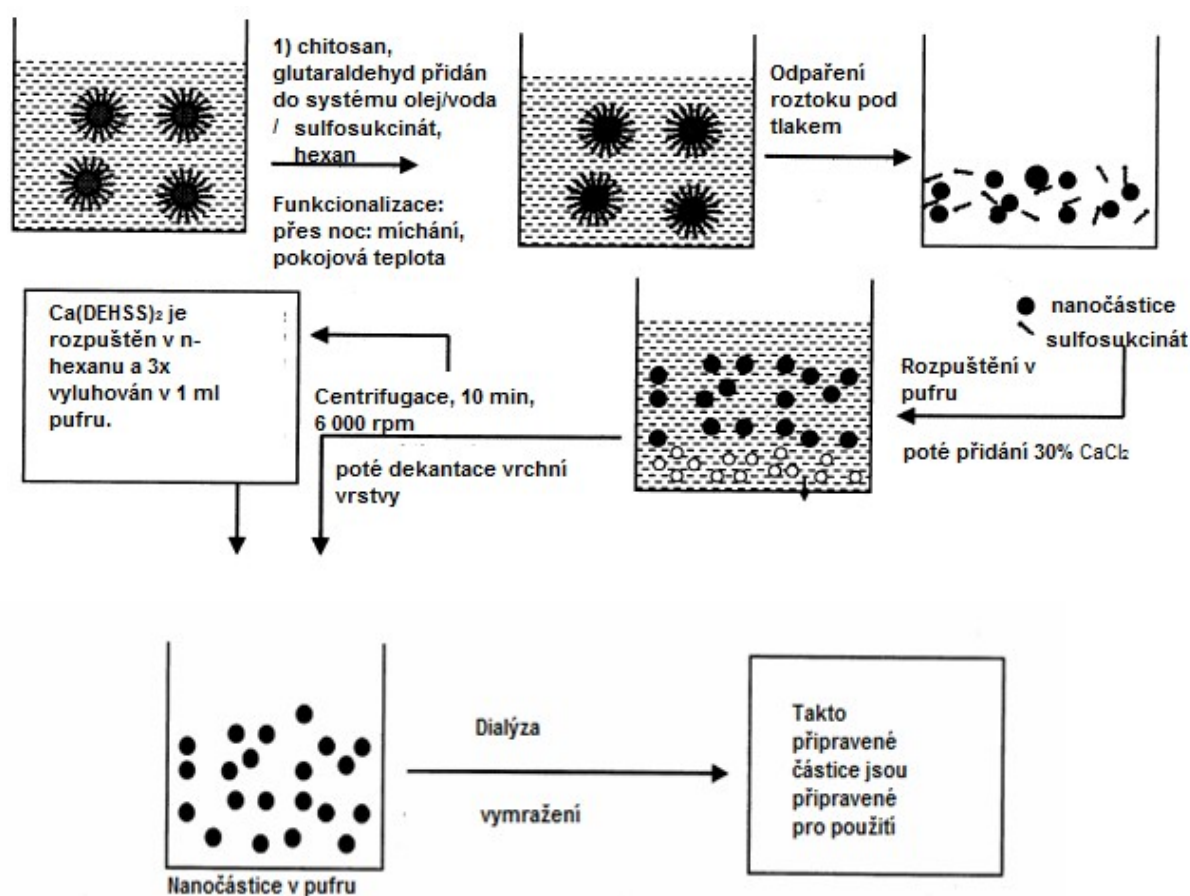
1.3 Imobilizace kovalentní vazbou

Nejpoužívanější metodou pro imobilizaci ligandu na povrch magnetického nosiče je imobilizace chemickou vazbou – kovalentní vazbou. Tuto techniku lze použít pro imobilizaci makromolekul (nukleové kyseliny, proteiny, protilátky atd.) (Aguilar-Arteaga a spol., 2010a). Vazba je dostatečně pevná a nedochází k uvolňování ligandu. Bylo prokázáno, že kovalentní vazby zvyšují stabilitu nosičů a pomáhají kontrolovat vazebná místa (Aguilar-Arteaga a spol., 2010a). Pro vytvoření kovalentní vazby (Obrázek 5) je nutné, aby nosič obsahoval funkční skupiny ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{CONH}_2$), které vytvoří chemickou vazbu s vhodnou funkční skupinou ligandů ($-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$). Karboxylová skupina ($-\text{COOH}$) s aminoskupinou ($-\text{NH}_2$) imobilizované látky tvoří amidovou vazbu, s thiolovou skupinou ($-\text{SH}$) thioesterové vazby a s alkoholovým zbytkem ($-\text{ROH}$) esterovou vazbu.



Obrázek 5: Schématická ukázka tvorby vazby mezi funkční skupinou ligandu magnetické částice a cílovou molekulou (Upraveno dle <http://pubs.rsc.org>)

Aktivační činidla podporují tvorbu vazby mezi povrchem magnetického nosiče a ligandem. Metoda aktivace anorganických povrchů, které jsou pokryty vrstvou silanu (tzv. silanizace), se aplikuje při funkcionalizaci $-NH_2$ skupinami. Dalším způsobem je modifikace vhodným biopolymerem, např. dextran. Tento děj je aktivován přidavkem jodistanu sodného. Vznikají příslušné dextranové polyaldehydy, které dále reagují s $-NH_2$ skupinou proteinů (Aguilar-Arteaga a spol., 2010). Funkcionalizované chitosanové částice, obsahující $-NH_2$ skupiny, se připravují smícháním chitosanových částic s glutaraldehydem v prostředí tenzidu (sulfosukcinát), který je rozpuštěn v hexanu (Maitra a spol., 1999; Banerjee a spol., 2002). Jednotlivé kroky přípravy funkcionalizovaných chitosanových částic jsou uvedeny na Obrázku 6.



Obrázek 6: Schéma přípravy chitosanových magnetických nosičů funkcionalizovaných glutaraldehydem (Banerjee a spol., 2002)

1.4 Nekovalentní interakce

Nekovalentní vazby hrají důležitou roli v chemických (ředění, sublimace, rozpouštění, krystalizace) a biochemických dějích (vazba enzym substrát, vlákna nukleových kyselin, struktura proteinů), proto nejsou tak silné jako vazby kovalentní. Mezi nekovalentní interakce se řadí: hydrofobní interakce, iontové síly, vodíkové můstky a Van der Waalsovy síly. Podmínkou vzniku nekovalentních vazeb je přítomnost vodného prostředí.

Hydrofobní interakce je snaha nepolárních molekul (části molekul) sdružovat se a tím co nejvíce snížit kontakt s vodou. Iontové síly jsou založeny na přitažlivosti opačně nabitých elektrostatických částic. Vodíkové můstky se tvoří mezi vodíkem a silně elektronegativním prvkem kyslíkem, dusíkem atd.). Van der Waalsovy síly jsou slabé interakce mezi molekulami, kdy síla vazby je závislá na vzdálenosti molekul (vzájemné působení nábojů molekul).

Nekovalentní imobilizace se používá například pro navázání proteinů. Tento způsob imobilizace ligandů na magnetický nosič je proveden technikou fyzikální sorpce. Metoda fyzikální sorpce je jednoduchá, rychlá, levná a šetrná k ligandu. Avšak nevýhodou je malá stabilita a spolehlivost oproti imobilizaci kovalentními vazbami. Nekovalentní vazba může být přerušena častým promýváním. Této vlastnosti se využívá při reversibilní imobilizaci proteinů (*Zhao a spol., 2011*). Reversibilní imobilizace je značně závislá na okolních podmínkách (pH, iontová síla, teplota).

1.5 Využití magnetických nosičů při izolaci DNA

Nukleové kyseliny se vyskytují ve dvou formách: hydratované a sbalené. Mezi těmito formami DNA je možný přechod v důsledku kondenzace makromolekuly (*Rosypal, 2006*). Magnetické částice lze využít k zakoncentrování vzorku metodou extrakce pomocí magnetických tuhých sorbentů. (magnetic solid - phase extraction, MSPE). Vzorek je zakoncentrován odseparováním magnetického nosiče z velkého objemu (*Aguilar-Arteaga a spol., 2010*). Toho se využívá např. pro zvýšení detekčních limitů běžných metod (*Aguilar-Arteaga a spol., 2010*). Magnetické separace se využívá také pro separaci celých buněk (prokaryotických i eukaryotických). Separace prokaryotických či eukaryotických buněk může být selektivní i neselektivní (*Li a spol., 2007*). Výhodou magnetické izolace DNA je kompatibilita a vysoká selektivita (*Taylor a spol., 2000*).

1.6 Využití elektrostatických sil při reverzibilní adsorpci na magnetické nosiče

Směr difuze molekuly DNA by měl vést přímo k magnetickému nosiči. Omezujícím faktorem je možnost afinity jiných molekul (jiných než nukleových kyselin) k magnetickému nosiči. Elektrostatické interakce musí být dominantní oproti dalším možným interakcím ve směsi, jako jsou například hydrofobní interakce (*Rhaman a spol., 2011*). Elektrostatické vazby se využívají k navázání DNA na magnetický nosič (*Knopp a spol., 2009*). Adsorpce na povrch nosičů probíhá lépe v prostředí s vysokou iontovou silou, naopak eluce DNA je efektivnější v prostředí s nízkou iontovou silou (*Shan a spol., 2012; Lee a spol., 2008*).

Makromolekula DNA se záporným nábojem, tvořeným fosfátovými zbytky, se váže na částice s pozitivním povrchovým nábojem v neutrálním pH (*Knopp a spol., 2009*). Povrch magnetického nosiče se funkcionalizuje například aminoskupinami ($-\text{NH}_2$), které jsou schopné protonace a vytvořit tak kladný náboj (*Rhaman a spol., 2011; Yoza a spol., 2002*). Aminoskupinami se obvykle funkcionalizují částice pokryté polymerní maticí s volnými karboxylovými (*Horák a spol., 2007; Ramanathan a spol., 2005*) nebo hydroxylovými skupinami (*Lee a spol., 2008*), případně částice s polystyrenovou maticí (*Yang a spol., 2008; Haihui a spol., 2012*). Pro extrakci a purifikaci nukleových kyselin se využívají křemičité částice nesoucí aminoskupiny ($-\text{NH}_2$), které poskytují kationtový povrchový náboj (*Veyret a spol., 2005; Del Compo a spol., 2005*). Silanizací skleněných substrátů aminosilanem získáme hustě posetý povrch aminoskupinami, které slouží pro upevnění DNA (*Nakagawa a spol., 2006*). Princip izolace DNA, pomocí vazby na aminoskupiny je uplatňován u křemičitých částic, které jsou funkcionalizované diethylaminoethanolem (DEAE) a jsou obsažené v agarosovém gelu. Tento způsob izolace DNA byl srovnán s metodou sloupcové ionexové chromatografie s křemíkovou náplní. Experiment prokázal, že DNA získaná magnetickou izolací měla sice nižší čistotu, ale výtěžky byly vyšší a metoda byla rychlejší (*Levison a spol., 1999*).

Dalším typem magnetických částic využívajících aminoskupiny k zachycení nukleových kyselin, které se využívá zejména v lékařské diagnostice, jsou hydrofilní magnetické nosiče nesoucí aminodextran (*Mouaziz a spol., 2009*). Chitosanové částice s navázaným glutaraldehydem rovněž obsahují množství aminoskupin, které se podílí na izolaci cílových molekul. Navázání a uvolnění cílové molekuly je podmíněno mnoha vlivy. Náboj chitosanové částice je ovlivněn převážně pH suspenze. Optimální pH pro adsorpci cílových molekul na chitosanové částice se pohybuje v kyselé oblasti. Taktéž uvolnění molekuly z chitosanových částic je rychlejší v kyselém pH (acetátový pufr), pak následuje alkalické a neutrální oblast pH (fosfátový pufr) (*Keawchaoon a spol., 2011*). Chitosanové modifikované magnetické částice byly použity pro extrakci DNA z geneticky modifikovaných sojových bobů (*Jiang a spol., 2012*). Chitosanem potažené částice křemičitanu byly použity jako alternativa, ke standardní izolaci DNA pomocí silika částic, pro extrakci DNA (*Hagan a spol., 2009*).

1.7 Adsorpce DNA na povrch silikagelu

Magnetické nosiče pokryté vrstvou silikagelu se hojně využívají v oblastech molekulární biologie a v biotechnologiích. Magnetické nosiče se silikagelem byly použity jako adsorbenty pro izolaci geonomové DNA z kukuřice. Získaná DNA byla vhodná jako matrice pro polymerázovou řetězovou reakci (*Taylor a spol., 2000*).

Při adsorpci plazmidu a chromozomální DNA na povrchu silikagelu byla zkoumána vazebná síla v závislosti na iontové síle, teplotě, pH, velikosti a konformaci DNA. Bylo zjištěno, že vazba je pevnější se zvyšováním entropie a s malou nebo nulovou hodnotou entalpie. Adsorpce DNA na magnetické nosiče pokryté silikagelem je vyšší za podmínek dehydratace DNA a křemičitých povrchů, zesílení pomocí mezimolekulárních elektrostatických sil a za přítomnosti mezimolekulárních vodíkových vazeb v kontaktní vrstvě DNA-křemík (*Melzak a spol., 1996*).

1.8 Adsorpce kondenzované DNA

Proces sbalení DNA se nazývá kondenzace, opačný jev dekonenzace (*Watson a Crieck, 1953*). Kondenzace je obvykle definována jako sbalení rozvinutého (hydratovaného) dvouřetězce DNA do kompaktních molekul (*Pollard a spol., 2008*). „*In vitro*“ je molekula DNA v roztoku difundována a vyskytuje se v uvolněné rozvinuté formě. Působením vnějších sil lze dosáhnout kondenzace molekuly DNA, např. za pomoci osmotického tlaku a monovalentních solí. Přítomnost soli způsobuje neutralizaci náboje DNA, což vede ke snížení odpuzování mezi molekulami DNA (*Králová a spol., 2001; Rosypal, 2006*). Nejběžněji využívaným kondenzačním činidlem je neutrální polymer polyethylenglykol spolu se sodnými ionty (Na^+ ve formě NaCl). Působení sodných iontů nestačí ke kondenzaci molekuly DNA, a proto se společně se solí přidává neutrální polymer polyethylenglykol, který způsobuje zvýšení osmotického tlaku (*Shan a spol., 2012*). Přejít DNA z rozvinuté do sbalené formy je indukován poly(ethylenglykolem) (PEG) ve směsi rozpouštědel - vodný roztok soli a methanolu. Kondenzace probíhá za určitých kritických podmínek koncentrace PEG. Hodnota koncentrace PEG závisí na stupni polymerace PEG, molárním zlomku PEG a methanolu, a na koncentraci přidané soli. S vyšším stupněm polymerace PEG a vyšší koncentrací soli klesá hodnota kritické koncentrace PEG (*Vasilevskaya a spol., 1995*). Sbalení DNA lze vyvolat snadněji použitím PEG o vysoké molární hmotnosti. Kondenzaci DNA rovněž podporuje přídavek methanolu (*Kleideiter a spol., 1999a*). Pro monitorování přechodu forem DNA byly použity tři metody: viskozimetrie, UV/Vis - centrifugace a dynamický rozptyl světla (DLS). Všechny tři metody potvrzují, že methanol a PEG působí synergicky. Pomocí techniky DLS lze stanovit nejen konformační změny, ale i molekulová hmotnost. Bylo zjištěno, že neexistují žádné přechodné konformační stavy molekuly DNA. Existuje pouze rozvinutá nebo sbalená forma DNA (*Kleideiter a spol., 1999b*).

Byla provedena studie adsorpční charakteristiky lineárního polymeru a dendimeru (makromolekuly o větvené struktuře) na oxidu hlinitém a oxidu křemičitém. Jako lineární polymer byl zvolen PEG. Dále byl testován dendimer poly(amidoamin) (PAMAM)

s navázanými karboxylovými skupinami (*Esumi a spol., 2001*). Test polymerů byl proveden ve vodných roztocích o hodnotě pH 5 (*Esumi a spol., 2001*). Poly(amidoamin) dendrimer adsorboval do značné míry jak na oxidu hlinitém, tak na oxidu křemičitém, zatímco poly(ethylenglykol) adsorboval nejlépe na silikagelu (*Esumi a spol., 2001*). Adsorbované množství PAMAM na oxid hlinitý bylo značně vyšší ve srovnání s množstvím PEG (*Esumi a spol., 2001*). Tento rozdíl může být způsoben rozdílnou interakcí polymeru s povrchem oxidu hlinitého. Hlavní silou interakce je elektrostatická přitažlivost (*Esumi a spol., 2001*). Při pH 5 je PAMAM záporně nabitý a interaguje s kladnými náboji hliníku, zatímco PEG je na povrch oxidu adsorbován prostřednictvím vodíkových vazeb mezi oxidem hlinitým a hydroxylovými skupinami (*Esumi a spol., 2001*).

1.9 Amplifikační metoda – PCR

Identifikací bakterií se rozumí porovnání určované bakterie se známou bakterií, obvykle se sbírkovým nebo typovým kmenem. Jedná se o proces, při kterém se zjišťuje, ke kterému známému taxonu (druhu) lze izolát přiřadit (*Ben Amor, 2007*). Klasické metody identifikace bakterií jsou založeny na studiu fenotypových vlastností (*Watson a Crieck, 1953*). Běžně využívané kultivační metody jsou složité, časově náročné, a ne vždy plně spolehlivé. Kultivovat lze pouze 1 % mikroorganismů přítomných v prostředí. Kromě toho lze fyziologické vlastnosti mikroorganismů ovlivnit podmínkami kultivace (*Turková a spol., 2011*). Proto se k detekci, identifikaci a kvantifikaci bakterií stále častěji používají nekultivační molekulárně-biologické metody. Nejpoužívanější metodou je polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR), která se používá k amplifikaci DNA (*Ehrmann a Vogel, 2005; Ben Amor, 2007; Švec, 2010*). Metodu PCR objevil v roce 1983 Kary Mullis, který za svůj objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Díky rychlosti analýzy a specifitě zažívá v posledních desetiletích velký rozmach také v potravinářském průmyslu. PCR je molekulárně-diagnostická metoda založená na cyklicky se opakující syntéze specifického úseku DNA. K vybranému úseku DNA se hybridizují krátké oligonukleotidy, tzv. primery, od nichž začíná syntéza nového řetězce. Syntéza je katalyzována termostabilní DNA polymerázou, která byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus* (proto se označuje jako *Taq* polymeráza) (*Lorenz, 2012; Bloomfield a spol., 2000*).

PCR se provádí v zařízení zvaném thermocycler (cyklátor) a spočívá v periodickém opakování tří po sobě jdoucích kroků:

- denaturace dsDNA; denaturace DNA probíhá při 95 °C
- připojení primerů; primery jsou hybridizovány při teplotě 50–65 °C (dle jejich nukleotidového složení)
- syntéza DNA; syntéza DNA probíhá při teplotě 68–75 °C.

Opakováním všech kroků PCR dochází exponenciální rychlostí k syntéze vybraného úseku DNA – PCR produktu (amplikonu). Počet opakování závisí na výchozí koncentraci

DNA, ale obvykle se výše uvedené cykly opakují 25 – 35krát. Počet cyklů je omezen, protože příliš vysoký počet opakování výrazně snižuje účinnost DNA polymerázy (Lorenz, 2012). Identifikace čistých kultur pomocí PCR bývá zpravidla bezproblémová, potíže však mohou nastat při izolaci DNA z komplexních vzorků, např. půdy, stolice, klinických vzorků nebo potravin. Falešně pozitivní výsledky v PCR lze eliminovat důsledným používáním dekontaminačních procedur (UV záření, chlornan sodný apod.) a přesným dodržáním pracovních postupů zejména při odběru a skladování vzorků. Závažnější problém představují falešně negativní výsledky, které jsou zpravidla způsobeny inhibitory PCR (organické a anorganické chemikálie, detergenty, antibiotika, pufrů, enzymy, polysacharidy, tuky a proteiny). Inhibitory PCR můžeme rozdělit na extracelulární a intracelulární. Intracelulární inhibitory jsou přítomny uvnitř buněk (např. endogenní nukleasy). Extracelulární inhibitory pocházejí z matrice vzorků (např. vápenaté ionty při analýze mléčných výrobků, polyfenoly), z chemikálií používaných při izolaci DNA (fenol, chloroform), ale také pylu, prachu z rukavic apod. (Schrader a spol., 2012; Hu a spol., 2015; Lorenz 2012). Velmi jednoduchým způsobem eliminace vlivu extracelulárních inhibitorů je reversibilní adsorpce DNA na magnetický nosič s využitím jednoduchých elektrostatických sil. Makromolekula DNA se záporným nábojem, tvořeným fosfátovými zbytky, se váže na nanočástice s pozitivním povrchovým nábojem v neutrálním pH (Trachtová, 2016).

1.10 Agarosová gelová elektroforéza

V této práci byla pro identifikaci ampliconů použita agarosová gelová elektroforéza. Jedná se o elektromigrační metodu, která se využívá pro identifikaci a separaci makromolekul (nukleových kyselin – DNA, RNA a proteinů). Agarosová gelová elektroforéza je vhodná a velmi často používaná metoda pro separaci fragmentů DNA různých velikostí v rozmezí od 100bp do 25 kb (Sambrook a Russell, 2001; Lee a spol., 2012). Principem metody je migrace záporně nabitě molekuly DNA v prostředí elektrického pole. Molekula DNA nese záporný náboj, který jí udílí záporně nabitě fosfátové skupiny. Záporně nabitá molekula putuje v elektrickém poli směrem ke kladně nabitě anodě.

Agarosa je izolována z rodů řas *Gelidium* a *Gracilaria* a skládá se z opakovaných podjednotek agarobiosy (L- a D-galaktosy) (Kirkpatrick, 1991; Lee a spol., 2012). Agarosa je polysacharid, který po smíchání s pufrům a zahřátí tvoří pórovitý gel, který se využívá jako vhodný nosič. Gel vytvoří síť polymerů s póry, kterými putují nabitě molekuly. Protože DNA má jednotný poměr hmotnost/náboj, molekuly DNA jsou v agarosovém gelu separovány dle velikosti. Rychlost migrace molekuly závisí na velikosti molekuly, koncentraci agarosy, konformaci DNA, aplikovaném napětí, přítomnosti ethidiumbromidu, typu agarosy a elektroforetickém pufru (Lee a spol., 2012). Menší fragmenty se pohybují rychleji. Pro analýzu se využívají různě husté gely (0,8% - analýza DNA, 1,8% - analýza PCR produktů). Vzorky jsou napipetovány spolu s nanášecím pufrům do jamek gelu a připravený gel je vložen do vany s elektroforetickým pufrům. Nanášecí pufr vzorky obarví a zviditelní, a zároveň zabrání vyplavení vzorku. Při vložení napětí začne probíhat elektromigrace. Migraci vzorku lze vizuálně kontrolovat díky nanášecímu pufru, který vzorek zviditelní.

Spolu se vzorky se nanáší na gel standardy (směsi fragmentů DNA o přesně definovaných délkách), které se využívají pro zjištění velikosti pomocí srovnání, a kontroly (pozitivní, negativní).

Po elektroforéze následuje vizualizace vzorků, kdy se gel ponoří do roztoku s interkalační fluorescenční barvivem, kdy specificky dochází k interkalaci do DNA. Následně se nenavázané barvivo vymývá ve vodě, tím zůstane jen barvivo navázané na DNA a je možno DNA vizualizovat pod UV zářením na UV transluminátoru.

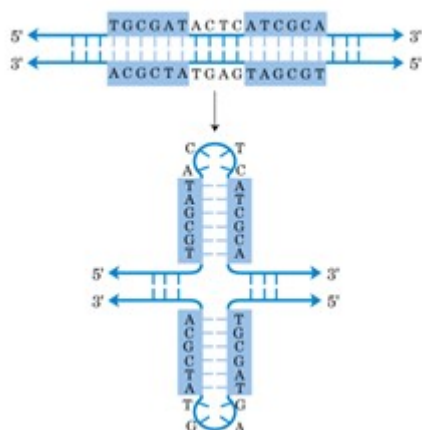
1.11 Analýza výskytu invertovaných repetic a kvadruplexů v genomu

V genomech jsou přítomny specifické sekvence DNA, které za vhodných podmínek mohou vytvořit kromě klasického duplexu i speciální struktury. Mezi takovéto typy sekvencí patří invertované repetice (IR) (tvoří vlásenky a křížové struktury), guaninové trakty (tvoří kvadruplexy), sekvence bohaté na tyminy a adeniny (tvoří triplexy) a sekvence bohaté na cytosiny (tvoří i-motivy - interkalované cytosinové kvadruplexy/motivy). Tyto sekvence se vyskytují ve všech organismech (prokaryotických i eukaryotických) (*Wang a Leung, 2009; Warburton, 2004; van Holde a spol., 1994*) a jejich lokalizace není náhodná, což koreluje s funkčně důležitými genomovými oblastmi (*Rhodes a Lipps, 2015; Bartas a spol., 2018; Brázda a spol., 2016; Strawbridge a spol. 2010*). Genomy a transkriptomy různých organismů, včetně modelového organismu *Escherichia coli* (*Rawal, 2006*), *Saccharomyces cerevisiae* (*Hershman a spol., 2008*) a lidí, obsahují řadu invertovaných repetic a sekvencí bohatých na G báze (*Huppert, 2005*). Původně byly tyto struktury prokázány v podmínkách *in vitro*, později byly také prokázány *in vivo* (*Rhodes a Lipps, 2015*).

Palindrom je specifický případ inverzní repetice, kde chybí nukleotidy oddělující jednotlivé inverzní repetice. Pokud invertovaná repetice neobsahuje žádnou chybu, nazývá se IR perfektní, pokud je v sekvenci přítomná chyba, nazývá se imperfektní. IR přítomné v regulačních oblastech DNA zůstaly evolučně konzervované (*Strawbridge a spol. 2010*), zatímco IR nepříznivě působící na genetickou stabilitu byly eliminovány (*Strawbridge a spol. 2010*). Nadměrný výskyt IR byl zaznamenán v promotorových oblastech a v místech iniciace replikace (*Čechová a spol., 2017*). Z inverzní repetice vhodné délky (šesti a více nukleotidů) mohou vznikat intramolekulárním párováním komplementárních bází křížové struktury – tzv. kruciformy (*Obrázek 7*). Křížové struktury obsahují čtyřcestné spojení, stopku a smyčku o různé velikosti (*Wang a Leung, 2006*). Kruciformy jsou cílové struktury pro histony, proto-onkogenní protein DEK a mnoho dalších strukturních a regulačních proteinů (*Brázda a spol., 2016*). Například protein p53 (hlavní nádorový supresor) se přednostně váže na sekvence obsahující invertované repetice, které mají schopnost vytvářet křížové struktury (*Jagelská a spol. 2010*), což demonstruje důležitost těchto struktur. Tento protein reguluje transkripci genů zapojených do zastavení buněčného cyklu, apoptózy a senescence (*Jost a spol., 1997; Espinosa, 2008; Mazur a spol., 1999*).

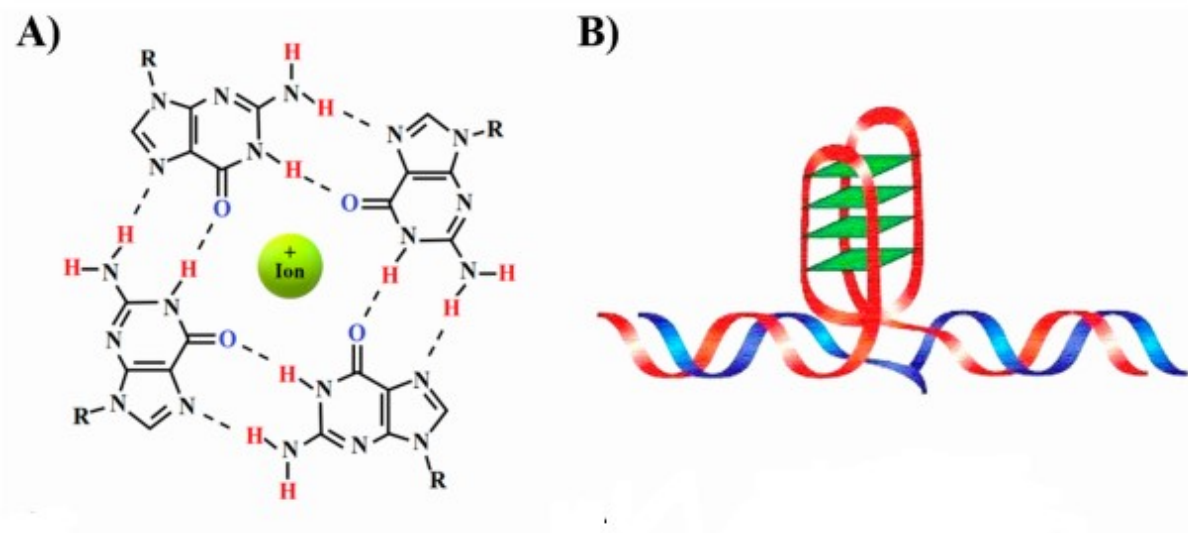
„Poloviční křížovou strukturou“ vyskytující se na jednom vlákně nukleových kyselin je vlásenka. Vlásenky jsou nejběžnější sekundární strukturou vytvářející se na RNA pomocí Watson-Crickova párování uvnitř molekuly. Sekvence na DNA, která kóduje vlásenku, musí

být také IR. Vláška přítomná v transkriptu bude mít pravděpodobně opět regulační funkci (Strawbridge a spol. 2010; Miura a spol. 2019; Dai a spol., 1997; Bikard a spol., 2010; Brázda a spol, 2011; Shlyakhtenko a spol., 2000).



Obrázek 7: Formování křížových struktur (Nelson a Michael, 2013)

Během posledních desetiletí byly objeveny čtyřvláknové struktury známé pod názvem Guaninové kvadruplexy (G-kvadruplexy). G-kvadruplex je tvořen sekvencemi bohatými na guanin, které se také označují jako G-trakty. Jedna čtveřice na sebe navázaných Guaninů se označuje jako G-kvartet/G-tetráda (Huppert, 2005). Vznik vodíkových vazeb mezi guaniny je umožněn Hoogsteenovým párováním bazí (Bedrat a spol., 2016; Kikin a spol., 2006). Kvadruplex a kvartet ilustruje Obrázek 8. G-kvadruplexové struktury, se často vyskytují v telomerech, promotorech a dalších biologicky významných oblastech genomu savců (Bartas a spol., 2018; Kikin a spol., 2006). Výskyt telomerních kvadruplexů je spojován se snížením aktivity enzymu telomerázy, která je zodpovědná za prodloužení telomer. Přibližně 85 % onkologických onemocnění je způsobeno v důsledku vysoké aktivity telomerázy, a proto je výzkum G-kvadruplexů důležitý pro vývoj léčiv (Huppert, 2005; Yang a spol., 2018).



Obrázek 8: G-kvadruplex (A) Guaninový kvartet stabilizovaný Hoogstenovým párováním, konkrétně jde o vodíkové vazby a kladně nabitý centrální ion (B) Schématická kresba kvadruplexové struktury formované na DNA (Bartas a spol., 2019)

Pomocí výpočetní techniky lze provádět hlubší analýzu genomu (Zuker, 2003). Pro analýzu potenciálních G-kvadruplexových struktur (PQS) existuje celá řada algoritmů (Bedrat a spol. 2016). Jedním z nevíce používaných algoritmů je G4Hunter (Bedrat a spol. 2016; Mishra a spol. 2019). Pro vyhodnocení obsahu G (resp. C na komplementárním řetězci), ve sledované sekvenci nukleových kyselin, tento algoritmus dává jednotlivým sekvencím G, GG, GGG a GGGG skóre 1, 2, 3 a 4 (Bedrat a spol. 2016). Cytosinové báze (C) jsou také hodnoceny, ale všechny hodnoty jsou negativní (Bedrat a spol. 2016). Obsah AT je irelevantní, takže skóre pro báze adeninu a thyminu je 0 (Bedrat a spol. 2016). Konečně, skóre G4Hunter je aritmetický průměr všech těchto hodnot (Bedrat a spol. 2016).

2. Cíl práce

Cílem dizertační práce je:

- Optimalizace přípravy buněčných lyzátů. Volba vhodného lyzačního činidla, jeho koncentrace, volba doby působení na buňky. Testování přidavku Proteinázy a SDS.
- Testování alternativních metod izolace nukleových kyselin z buněčných lyzátů
- Optimalizace reakčních podmínek izolace nukleových kyselin z buněčných lyzátů pomocí polymerních nosičů. Testování reakčních pufrů pro adsorpci nukleových kyselin na nosiče a elučních pufrů.
- Izolace nukleových kyselin z potravinových matric pomocí nosičů
- Studium sekundárních struktur nukleových kyselin pomocí bioinformatické analýzy u mikroorganismů využívaných v potravinářském průmyslu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. Materiál a metody

3.1 Kultivační média

- MRS tekuté médium

MRS médium bylo připraveno dle návodu od výrobce, kdy v 1 000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 52 g MRS média, pH média bylo upraveno na hodnotu 6,2. Poté bylo médium sterilizováno v autoklávu (121 °C/15 minut).

3.2 Roztoky pro přípravu buněčných lyzátů

- Roztok A (10 mM Tris pH 7,8; 5 mM EDTA pH 8,0)

Sterilně bylo smícháno: 1 ml 1M Tris HCl, pH 7,8 (80 ml destilované vody bylo rozpuštěno v 12,1 g Tris-base. Hodnota pH byla upravena pomocí koncentrované HCl. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml), 1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (202,2 g EDTA bylo převedeno do 800 ml destilované vody a umístěno na magnetickou míchačku. Hodnota pH byla upravena přidáním asi 20 g NaOH v peletkách. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 1 l.

- Lyzační roztok s obsahem lysozymu 3 mg/ml (10 mM Tris pH 7,8; 5 mM EDTA pH 8,0; lysozym 3 mg/ml)

K roztoku A byl před použitím přidán lysozym (3 mg/ml).

- SDS (20 %)

20 g SDS bylo rozpuštěno v 80 ml sterilní destilované vody. Roztok byl zahřát na 68 °C. Hodnota pH byla upravena na 7,0 několika kapkami koncentrované HCl. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml.

3.3 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA a reakční pufry

- Roztok CIZ

Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1

- 5M NaCl

58,4 g NaCl bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 200 ml. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C/15 minut).

- 40% PEG 6000

40 g PEG 6000 bylo rozpuštěno v 60 ml sterilní destilované vody. Objem byl doplněn sterilní destilovanou vodou do 100 ml. Roztok byl uchován při 4 °C.

- 70% ethanol

Bylo smícháno 70 ml 96 % ethanolu a 26 ml destilované vody.

- TE pufr pH 7,8

Sterilně bylo smícháno 1 ml 1 M Tris (pH 7,8) a 100 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98,9 ml destilované vody (na výslednou koncentraci 0,01 M Tris a 0,001 M EDTA).

- Tris pufr o hodnotě pH 5,2; 7,0 a 8,00

Rozpuštěním 121,1 g Tris báze v 800 ml destilované vody byl připraven zásobní roztok 1M Tris. Tento roztok byl naředěn na 10mM a pH bylo upraveno přidávkou 0,1 M HCl. Roztok byl sterilizován při 121 °C po dobu 15 minut.

- 0,1 M fosfátový pufr pH 6,0; 7,0 a 7,8

Byl připraven roztok 0,2 M Na_2HPO_4 : V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 35,61 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 53,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / 71,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Dále byl připraven roztok 0,2 M NaH_2PO_4 : V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 27,60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / 31,21 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Požadovaný roztok příslušné hodnoty pH získáme smícháním obou roztoků v příslušném poměru dle Tabulky 2, viz. níže.

Tabulka 2: Příprava fosfátového pufru o příslušné hodnotě pH

pH	Roztok 0,2 M Na ₂ HPO ₄ (ml)	Roztok 0,2 M NaH ₂ PO ₄ (ml)
6,0	0,62	4,39
7,0	3,05	1,95
7,8	4,58	0,43

Takto připravené roztoky byly doplněny destilovanou vodou na objem 10 ml. Roztoky byly sterilizován při 121 °C.

- Fosfátový pufr pH 5,59; 5,91 a 6,24 (Sörensen)

Byl připraven roztok 0,1 M KH₂HPO₄: Ve 250 ml destilované vody bylo rozpuštěno 2,27 g K₂HPO₄.

Dále byl připraven roztok 0,1 M Na₂HPO₄: Ve 250 ml destilované vody bylo rozpuštěno 2,97 g Na₂HPO₄ · 2H₂O.

Požadovaný roztok příslušné hodnoty pH získáme smícháním obou roztoků v příslušném poměru dle Tabulky 3, viz. níže.

Tabulka 3: Příprava fosfátového pufru o příslušné hodnotě pH

pH	Roztok 0,1 M KH ₂ HPO ₄ (ml)	Roztok 0,1 M Na ₂ HPO ₄ (ml)
5,59	9,5	0,5
5,91	9,0	1,0
6,24	8,0	2,0

Roztok byl sterilizován při 121 °C.

- Prací prostředky

Tabulka 4: Prací prostředky využívané pro přípravu lyzačních roztoků

Prací prostředek	Forma	Výrobce	Označení v experimentu
SA8 TM – Premium + BIOQUEST prací prášek	prášek	Amway TM	Prášek A
PERSIL universal: Gold tekutý prací gel	tekutý gel	Henkel	Prášek B
PERSIL Color prací gel pro barevné prádlo	tekutý gel	Henkel	Prášek C
PERSIL color pulver: Gold	prášek	Henkel	Prášek D
PER 100% - univerzální prací gel	tekutý gel	Complete	Prášek E

3.4 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu

- 5x TBE pufr

54 g Tris-base a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Objem byl doplněn destilovanou vodou do 1 l. Před použitím byl roztok 10 x naředěn na výslednou koncentraci 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá a 1 mM EDTA.

- 1,8% /0,8% agarosový gel

1,8 g/ 0,8 g agarosy bylo rozvařeno ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru.

- Ethidium bromid (0,5 µg/ml)

100 µl roztoku EtBr o koncentraci 2,5 mg/ml bylo zředěno 500 ml sterilní vody.

3.5 Bakteriální kultury

V experimentech byly použity bakteriální kmeny, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM Brno, ČR).

Lactobacillus rhamnosus CCM 1825

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* CCM 212/106

Lactobacillus casei subsp. *casei* CCM 7088

Lactobacillus plantarum CCM 7039

Lactobacillus fermentum CCM 7192.

3.6 DNA z kuřecích erythrocytů

DNA z kuřecích erythrocytů byla získána z Masarykovy Univerzity v Brně.

3.7 Potravinové vzorky

Byly zvoleny mléčné výrobky, které na svém obalu deklarovaly přítomnost bakteriální kultury (Tabulka 5)

Tabulka 5: Přehled testovaných mléčných výrobků (Upraveno dle: <http://www.mlekarna-valmez.cz/>; <http://www.mlekarna-kunin.cz/>; <http://www.olma.cz/>; <http://www.actimel.cz/>;)

Bílý jogurt	Výrobce	Složení
Bílý jogurt z Valašska	Mlékárna Valašské Meziříčí, spol. s r.o.	mléko, mléčná bílkovina, živá jogurtová kultura
Smetanový bílý jogurt Kunín	Mlékárna Kunín a.s.	smetana, jogurtová kultura, probiotická kultura
Klasik bílý jogurt OLMA	OLMA a. s.	mléko, mléčná bílkovina, živá jogurtová kultura
Actimel bílý	Danone a. s.	mléko, cukr (V, PL) nebo tekutý cukr (B) (7,3% sacharóza), glukóza, jogurtová kultura a <i>L.casei</i> DN 114001, vitamíny B6 , D. Obsah tuku nejméně 1,1% hmot.

Acidofilní mléko plnotučné	Mlékárna Valašské Meziříčí, spol. s r.o.	mléko, mléčná kultura, probiotické kultury (Lactobacillus Acidophilus, Bifidobacteria, Streptococcus Thermophilus), obsah tuku min 3,6 %.
Smetanový jogurt Florian – jahoda	OLMA a. s.	smetana (10% tuku), ovocná složka 15%, (cukr, ovoc.složka 30%, zahušťovadla: modifikovaný škrob a pektin, barvivo betanin, aroma), živé jogurtové kultury
Smetanový jogurt jahoda	Mlékárna Valašské Meziříčí, spol. s.r.o.	smetana, cukr (součást ovocné složky 14%), jahody plod (součást ovocné složky 14%), aroma (součást ovocné složky 14%), jogurtová kultura
Jogobella jogurt – mango	Zott s.r.o.	mléko, mango, koncentrát manga, glukozo- fruktozový sirup, cukr, sušené mléko, E100 Kurkumin (CI přírodní žlut' 3), aroma, jogurtová kultura
Bílý jogurt	Madeta a.s.	plnotučné mléko,sušené mléko, jogurtová kultura
Naše BIO jogurt jahodový	OLMA a. s.	bio mléko, bio ovocná složka 23% (bio jahody 50%, bio třtinový cukr, bio koncentrát šťávy z aronie, stabilizátory pektin a bio karubin, bio koncentrát citronové šťávy), sušená syrovátka, jogurtová kultura

3.8 Polymerní magnetické nosiče

Pro izolaci nukleových kyselin byly použity polymerní nosiče, které byly syntetizovány na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze Ing. Danielem Horákem, CSc.

Tabulka 6: Přehled použitých nosičů a jejich vlastnosti

Nosič	Polymer	Průměr nosičů (μm)	Funkcionalizace povrchu
Imobilizovaný lysozym	(P(HEMA-co-GMA)	2,20	lysozym
Fkol 135ox	P(HEMA-co-GMA)	1,00	2,61 mM/g -COOH
P(HEMA-co-GMA)- NH ₂	P(HEMA-co-GMA)	4,00	-NH ₂
F79/L3 poly-LYSINE (mw = 93800)	-	0,01	lysin

3.9 Přístroje

Byla použita analytická váha Pioneer OHAUS (OHAUS, USA), Centrifuga (Eppendorf AG, Hamburg, Německo), Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo). Pro provedení gelové agarosové elektroforézy bylo použito elektroforetické zařízení Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA) a zdroj elektrického napětí Lighting volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA), pro separaci nukleových kyselin magnetický separátor Invitrogen Dynal AS (Dynal Biotech, Oslo, Norsko), NanoPhotometr (Implen, Německo) pro stanovení čistoty a koncentrace nukleových kyselin. Pro amplifikaci nukleových kyselin byly použity Termocycler Bioer GeneQ (BIOER TECHNOLOGY, Čína), Termocycler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA), Minicycler PTC 150 (MJ Research, Watertown, USA). Dále byla použita Minicentrifuga C1301 (Labnet international, Inc., USA) a Transluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA).

3.10 Kultivace mikroorganismů rodu *Lactobacillus*

Byla připravena kultivační zkumavka s 10 ml MRS média, která byla předeřhřata na 37°C. Jako inokulum bylo použito 100 μl bakteriální kultury, uchovávané v 15% roztoku glycerolu v mrazáku při -80 °C, do tekutého živného média. Poté byly kultivační zkumavky umístěny v termostatu (37 °C) na 24 hod. Kultivace probíhala aerobně.

3.11 Příprava vzorků

3.11.1 Příprava vzorků tekutých mléčných výrobků

U tekutých mléčných výrobků (Actimel, acidofilní mléko) byl použit 1 ml vzorku, který byl centrifugován 14100 g, 3 min. Poté byl slit supernatant (supernat.) a ke vzorku byl přidán 1 ml sterilní destilované vody a vše bylo dobře promícháno.

3.11.2 Příprava vzorků jogurtů

K 1 g jogurtu byl přidán 1 ml sterilní destilované vody a vše bylo důkladně promícháno. 1 ml vzorku byl centrifugován při 14100 g, 3 min. Poté byl slit supernatant a ke vzorku byl přidán 1 ml sterilní destilované vody a vše bylo dobře promícháno.

3.12 Příprava buněčných lyzátů

3.12.1 Příprava buněčných lyzátů z bakteriálních kultur a mléčných výrobků pomocí lysozymu

Do 1,5ml zkumavky Eppendorf byl napipetován 1 ml vzorku (bakteriální kultura narostlá v tekutém MRS, nebo mléčný výrobek). Vzorek byl odstředěn při 14100 g, 5 min. Supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 1 ml roztoku A (10 mM Tris o pH 7,8 5 mM EDTA; pH 8,0). Poté byl vzorek opět centrifugován při 14100 g, 5 min. a sediment byl resuspendován v roztoku s lysozymem (10 mM Tris o pH 7,8; 5 mM EDTA; pH 8,0; 3 mg/ml lysozym). Vzorek byl ponechán hodinové inkubaci při pokojové teplotě. Po hodinové inkubaci bylo ke vzorku přidáno 50 µl 20%SDS a 5 µl Proteinázy K (100 µg/ml). Vzorek byl promíchán a ponechán inkubaci při 55 °C do druhého dne.

3.12.2 Příprava buněčných lyzátů z bakteriálních kultur pomocí roztoku pracího prostředku

Do 1,5ml zkumavky Eppendorf byl napipetován 1 ml vzorku (bakteriální kultura narostlá v tekutém MRS). Vzorek byl odstředěn při 14100 g, 5 min. Supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 1 ml roztoku A. Poté byl vzorek opět centrifugován při 14100 g, 5 min a sediment byl resuspendován v 4% roztoku pracího prostředku obsahujícího enzymy. Vzorek byl ponechán hodinové inkubaci při pokojové teplotě. Po hodinové inkubaci bylo ke vzorku

přidáno 50 µl 20% SDS a 5 µl Proteinázy K (100 µg/ml). Vzorek byl promíchán a ponechán inkubaci při 55 °C do druhého dne.

3.12.3 Příprava buněčných lyzátů z potravinářských matric pomocí roztoku pracího prostředku

Do zkumavky o objemu 1,5 ml byl odebrán 1 ml vzorku (jogurt byl resuspendován ve sterilní vodě v poměru 1:1). Následně byl vzorek odstředěn při 14100 g dobu 5 min. Po slítí supernatantu byl sediment opět resuspendován v 1 ml sterilní vody. Promývání bylo 4x opakováno. Poté byl sediment resuspendován v 1 ml 4% roztoku pracího prostředku a ponechán 1 h/3 h při laboratorní teplotě. Poté bylo k vzorku přidáno 50 µl 20%SDS a 5 µl Proteinázy K (100 µg/ml).

3.12.4 Příprava buněčných lyzátů pomocí imobilizovaného lysozymu na magnetické nosiče

Z připravené buněčné suspenze byl odebrán 1 ml a byl centrifugován při 14100 g, 3 min. Získaný sediment byl resuspendován v 1ml roztoku A a poté byla suspenze opět centrifugována 3 min při 14100 g. Po slítí supernatantu byl sediment resuspendován v 490 µl roztoku A a 10 µl imobilizovaného lysozymu. Buněčná směs s lysozymem byla inkubována 1, 3 a 5 h při pokojové teplotě.

3.13 Izolace nukleových kyselin

3.13.1 Fenol-chloroformová extrakce

Tato metoda byla prováděna dle *Sambrook a Russel, 2011*.

3.13.2 Magnetická separace kondenzované DNA

Dle Tabulky 7 byla namíchána separační směs do 1,5ml zkumavek Eppendorf. Pořadí jednotlivých komponent zůstalo zachováno. Poté byla směs inkubována po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly zkumavky se separační směsí umístěny do magnetického separátoru a zde byly ponechány po dobu 15 min.

Tabulka 7: Reakční směs pro magnetickou separaci

Pořadí	Komponenta	Objem (μl)
1.	NaCl (5 M)	400
2.	Buněčný lyzát	100
3.	PEG 6000 (40 %)	400
4.	Magnetické nosiče (2 mg/ml)	100
	Výsledný objem	1000

Ze zkumavek byl pomocí pipety odebrán supernatant (v případě testování reakčních podmínek byl supernatant uchován pro další zpracování). Zkumavky byly vyjmuty z magnetického separátoru a magnetické nosiče byly promyty 700 μl 70 % ethanolu. Promývání ethanolem bylo zopakováno a poté byly otevřené zkumavky umístěny do termostatu (56 °C), aby došlo k odpaření zbytkového ethanolu (nutno kontrolovat, aby nedošlo k přesušení magnetických nosičů). Poté byly zkumavky vyjmuty z termostatu a magnetické nosiče byly resuspendovány v 200 μl TE pufru. Zkumavky byly uloženy do chladničky (5 °C), kde byly ponechány do dalšího dne. Po 24 h byly zkumavky vloženy do magnetického separátoru a eluát byl odpipetován do čisté zkumavky Eppendorf.

3.13.2.1 Testování reakčních pufrů pro separaci DNA pomocí nosičů

Nosiče byly 24 h dopředu resuspendovány v příslušném pufru. Rovněž DNA kuřecích erythrocytů byla 24 h dopředu smíchána s příslušným reakčním pufrem. Dle Tabulky 8 byla namíchána separační směs. Separační směs byla ponechána hodinové inkubaci při pokojové teplotě za občasného promíchání. Poté byl oddělen supernatant.

Tabulka 8: Příprava separační směsi v prostředí příslušného pufru

Pořadí	Komponenta	Objem (μl)
1.	DNA kuřecích erythrocytů v příslušném reakčním pufru	50
2.	Nosiče v daném pufru	50
	Výsledný objem	100

Supernatant byl uchován pro další zpracování (spektrofotometrické měření koncentrace DNA). Poté byly nosiče 2x promyty 700 μl 70 % ethanolu. Otevřené zkumavky byly umístěny do termostatu (56 °C). Po odpaření zbytkového ethanolu byly zkumavky vyjmuty z termostatu a nosiče byly resuspendovány ve 100 μl TE pufru. Zkumavky byly umístěny do lednice (5 °C). Po oddělení nosičů (po 24 hod) byl eluát převeden do čisté zkumavky Eppendorf.

3.13.2.2 Separace DNA z mléčných výrobků v prostředí reakčního pufru pomocí nosičů

Nosiče byly 24 h dopředu resuspendovány v příslušném pufru. Dle Tabulky 9 byla namíchána separační směs. Separační směs byla ponechána hodinové inkubaci při pokojové teplotě za občasného promíchání. Poté byl oddělen supernatant.

Tabulka 9: Příprava separační směsi pro separaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí příslušného pufru

Pořadí	Komponenta	Objem (μl)
1.	Buněčný lyzát	400
2.	Reakční pufr	400
3.	Nosiče v daném pufru	100
	Výsledný objem	900

Poté byly magnetické nosiče 2x promyty 700 μl 70% ethanolu. Otevřené zkumavky byly umístěny do termostatu (56 °C). Po odpaření zbytkového ethanolu byly zkumavky vyjmuty z termostatu a nosiče byly resuspendovány v 100 μl TE pufru. Zkumavky byly umístěny

do lednice (5 °C). Po oddělení nosičů (po 24 hod) byl eluát převeden do čisté zkumavky Eppendorf.

3.13.3 Vysolování DNA

K 500 µl buněčného lyzátu byl přidán definovaný objem 5,5 M NaCl a sterilní destilované vody do objemu 1 ml (Tabulka 10). Směs byla promíchávána 10 minut a centrifugována při 14100 g po dobu 15 minut. K 50 µl supernatantu bylo přidáno takové množství sterilní destilované vody, aby výsledná koncentrace NaCl byla asi 0,3 M a 2,5x větší množství ethanolu (Tabulka 10). DNA byla srážena 15-30 minut při –20 °C a byla centrifugována 15 minut při 14100 g. Sediment byl vysušen v exikátoru a resuspendován v 120 µl TE pufru.

Tabulka 10: Izolace DNA vysolováním s použitím chloridu sodného

Postup	Buněčný lyzát (µl)	5,5 M NaCl (µl)	H ₂ O (µl)	Koncentrace NaCl (M)
1	500	100	400	0,55
2	500	200	300	1,10
3	500	300	200	1,65
4	500	400	100	2,20
5	500	500	0	2,75

3.14 Spektrofotometrické měření a stanovení čistoty DNA

Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru NanoPhotometr. Pro měření byla použita kyveta Label Gard. Měření bylo prováděno v programu Label Gard Application - analýza Nucleic acid pro dsDNA. Dle předpokládané koncentrace DNA bylo vybráno lid víčko, viz. Tabulka 11.

Tabulka 11: Výběr lid víčka při spektrofotometrickém měření

Lid víčko	lid 5	lid 10	lid 50
Optická dráha (nm)	2	1	0,2
Měřitelný rozsah koncentrace DNA (ng/µl)	7-350	14-700	250-4000
Objem vzorku (µl)	6-10	3-5	0,7 - 4

3.15 Polymerázová řetězová reakce

PCR byla provedena s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*, velikost amplikonu 250 bp (Dubernet a spol., 2002). Byla namíchána PCR směs dle Tabulky 12 – základní složení. Obsah jednotlivých komponent v PCR směsi byl upravován. Byl zachován objem směsi 25 µl.

Tabulka 12: Základní složení PCR směsi s primery pro rod *Lactobacillus*

Komponenta PCR směsi	Množství (µl)
Voda pro PCR	19,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
dNTP směs (10 mM)	0,5
Primer LbLMA 1-rev (10 pmol/µl)	0,5
Primer R16-1 (10 pmol/µl)	0,5
Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/µl)	1,0
Matrice DNA	1,0
Celkový objem	25,0

Tabulka 13: Specifické sekvence použitých primerů (Dubernet a spol., 2002):

Primer	Sekvence 5'-3'	Teplota hybridizace	Velikost amplikonu (bp)
LbLMA 1-rev	CTCAAAACT AACAAAGTTTC	55	250
R16-1	CTTGTACACACCGCCCGTCA		

Pozitivní kontrolu tvořila DNA získaná fenol-chloroformovou extrakcí ze sbírkového kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825. Při míchání PCR směsi pro negativní kontrolu byla DNA matrice nahrazena vodou pro PCR.

Na termocycleru byly nastaveny následující reakční podmínky:

Reakční podmínky:

1. 95 °C/ 5 min.
2. 95 °C/ 0,5 min. denaturace DNA
3. 55 °C/ 0,5 min. hybridizace primerů
4. 72 °C/ 0,5 min. syntéza DNA řetězce
5. 29x opakované kroku 2. - 4.
6. 72 °C/ 10 min. syntéza DNA řetězce
7. 10 °C/ neomezeně dlouhá doba

3.16 Detekce DNA a PCR pomocí agarosové gelové elektroforézy

Pro detekci DNA byl připraven 0,8 % agarosový gel. Pro nanášení vzorku bylo použito 15 µl vzorku DNA a 3 µl nanášecího pufru. Pro detekci PCR produktů byl připraven 1,8 % agarosový gel. Pro nanášení vzorku bylo použito 25 µl vzorku PCR produktu a 5 µl nanášecího pufru. Gel byl uložen do elektroforetické vany (Elektroforetické zařízení Easy-Cast, model B1). Pro elektroforézu byly nastaveny podmínky: 80 V, 2 hod. Poté byl gel z vany vyjmut a vložen do lázně obsahující roztok ethidium bromidu (30 min). Po opláchnutí gelu byl gel osvětlen pomocí transluminátoru TVR 3121 a přes ochrannou clonu byla pořízena fotografie gelu.

3.17 Bioinformatická analýza

Množství IR a kvadruplexů bylo kvantifikováno pomocí programů: Palindrome Analyseru a G4Hunteru. Tyto nástroje jsou součástí DNA Analyseru, který je webovým serverem pro analýzu nukleotidových sekvencí. Palindrome Analyser je webový software, který generuje informace o přítomnosti invertovaných repetit v libovolných sekvencích DNA. G4Hunter vyhledává G-kvadruplexy vyskytující se v nukleových kyselinách. Sekvence DNA byly přeneseny z NCBI.

3.17.1 Výběr DNA sekvence

Veškeré sekvence použité pro analýzy byly staženy z databáze NCBI.

3.17.2 Palindrom Analyser

Palindrome Analyser může zobrazovat a analyzovat IR v DNA sekvencích podle tří základních parametrů: délka IR, délka smyčky mezi IR (spacer) a počet chybných párů bází v IR. Je také možné vizualizovat lokalizaci a distribuci vybraného typu IR a porovnat četnost a typy IR v různých genomech (Brázda a spol., 2016).

Sekvence může být vložena jako prostý text nebo přímo importovaná z NCBI. Uživatel může filtrovat a definovat IR test v nukleotidové sekvenci podle délky IR, délky spaceru a počtu chybně spárovaných/nespárovaných (párů) bází (Brázda a spol., 2016). Pro analýzu IR byly nastaveny následující parametry: délka IR 10–30, délka smyčky 0–10 a počet chyb 0 a 1.

3.17.3 *G4Hunter*

Software G4Hunter byl použit pro analýzu výskytu kvadruplexů. Byly nastaveny parametry pro analýzu v G4Hunteru: velikost okna pro zobrazení 25 a citlivost (G4Hunter score) od 1,2. Z databáze NCBI byly naimportovány sekvence pro zkoumané genomy. Po zadání podmínek a načtení sekvencí byla spuštěna analýza.

3.17.4 *Analýza výskytu IR a kvadruplexů v oblastech anotovaných znaků*

Z databáze NCBI byla stažena tabulka anotovaných znaků obsahující genomické sekvence DNA. Byla provedena analýza výskytů IR a kvadruplexů uvnitř a v okolí těchto sekvencí (± 100 bp). Získaná data byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel.

4. Výsledky

4.1 Příprava buněčných lyzátů

Tato kapitola se zaměřuje na testování různých lyzačních činidel. Zahrnuje optimalizaci doby působení lyzačních činidel na buňky, nalezení optimální koncentrace lyzačního činidla. Dále se zabývá vlivem SDS a Proteinázy K při přípravě buněčných lyzátů.

4.1.1 Testování vlivu SDS a Proteinázy K při přípravě buněčných lyzátů

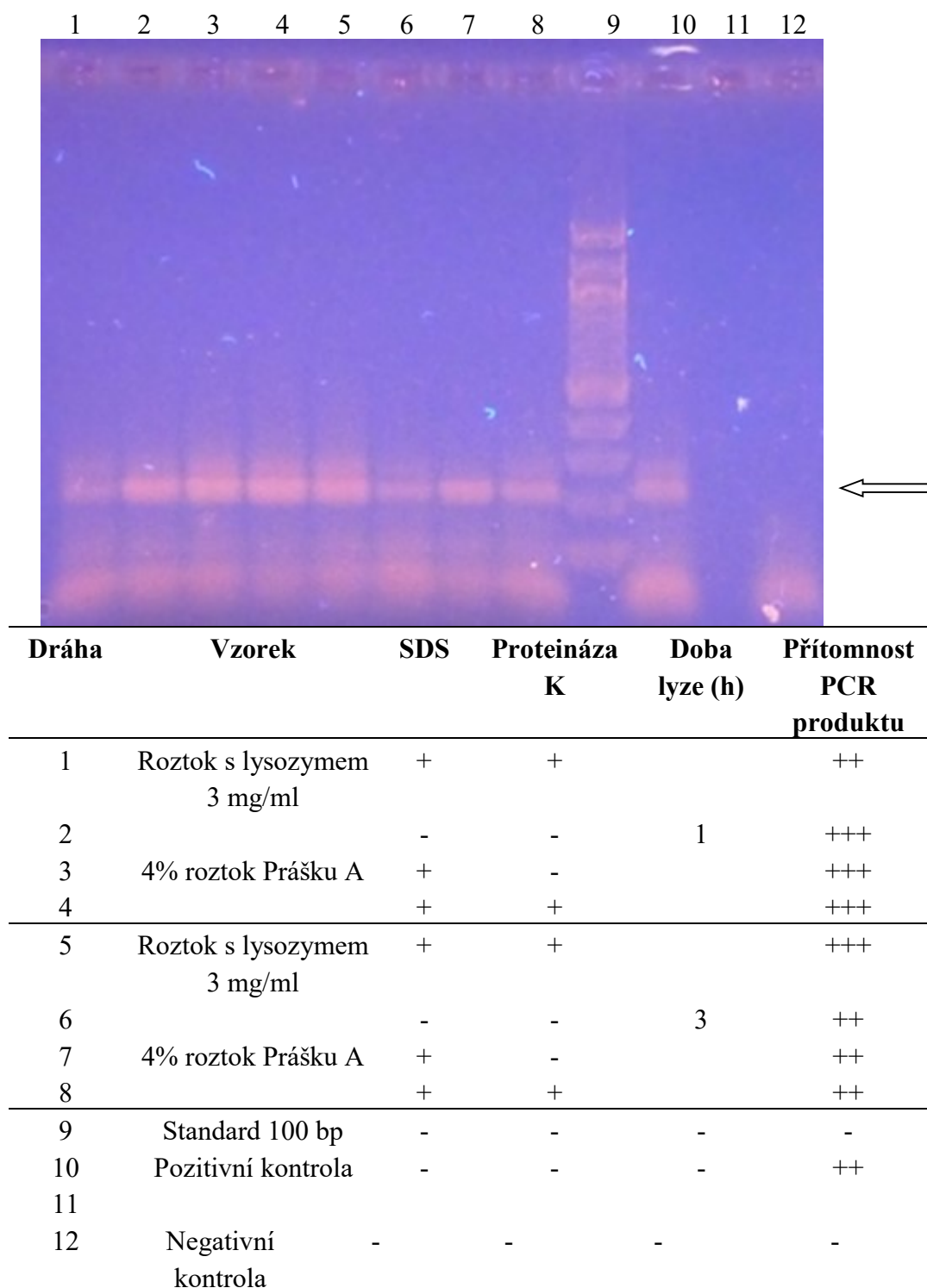
V tomto experimentu byly použity buňky kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212. Pro přípravu buněčných lyzátů byl použit roztok obsahující lysozym 3 mg/ml a 4% roztok pracího přípravku Prášku A. Doba působení lyzačního roztoku byla 1 h a 3 h. Po uplynutí této doby bylo k některým vzorkům přidáno SDS a Proteináza K dle Tabulky 14.

Tabulka 14: Přehled použitých lyzačních činidel, doby působení lyzačních činidel a přidavek SDS a Proteinázy K při přípravě buněčných lyzátů

	Lyzační činidlo	Doba lyze (h)	SDS	Proteináza K
1.	Roztok s lysozymem 3 mg/ml	1	+	+
2.	4% roztok Prášku A	1	-	-
3.	4% roztok Prášku A	1	+	-
4.	4% roztok Prášku A	1	+	+
5.	Roztok s lysozymem 3 mg/ml	3	+	+
6.	4% roztok Prášku A	3	-	-
7.	4% roztok Prášku A	3	+	-
8.	4% roztok Prášku A	3	+	+

+ s komponentou; - bez komponenty

Ze získaných buněčných lyzátů byla izolována DNA pomocí metody magnetické separace. V tomto experimentu byly využity magnetické nosiče Fkol 135ox. Získaná DNA byla použita jako matrice při přípravě PCR směsi. Při amplifikaci byly použity primery specifické pro rod *Lactobacillus*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z bakterií *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825. PCR produkty byly naneseny na gel a byla provedena gelová agarosová elektroforéza. Poté byly detekovány PCR produkty (250 bp) viz. *Obrázek 9*.



* mg/ml; + s komponentou; - bez komponenty

Obrázek 9: PCR produkty (250 bp) detekované pomoci gelové agarosové elektroforézy; testování vlivu SDS a Proteinázy K při přípravě buněčných lyzátů

Na *Obrázku 9* jsou viditelné PCR produkty získané amplifikací DNA. Ve všech případech, kromě negativní kontroly, došlo k amplifikaci DNA. Referenční vzorky (*Obrázek 9 - dráha 1. a 5.*) byly lyzovány pomocí lyzačního roztoku s obsahem lysozymu 3 mg/ml. Lepších výsledků bylo dosaženo u vzorků, které byly podrobeny hodinové inkubaci v průběhu lyze buněk, oproti vzorkům, kde byla doba působení lyzačního činidla 3 hod. Bylo zjištěno, že při přípravě buněčných lyzátů pomocí roztoku pracího prostředku Prášku A, není zapotřebí použít přídavek SDS a Proteinázy K. Tento prací prostředek pravděpodobně obsahuje detergenty a enzymy potřebné k rozrušení buněčné stěny a k prasknutí cytoplazmatické membrány. Z takto připravených buněčných lyzátů lze izolovat DNA, která je vhodná pro použití do PCR. Roztoky pracích prášků tedy mohou nahradit běžně využívané enzymy a detergenty po přípravu buněčných lyzátů. Tento postup je finančně výhodnější.

4.1.2 *Optimalizace koncentrace lysozymu v lyzačním roztoku a následná detekce izolované DNA metodou PCR*

Cílem experimentu bylo najít optimální koncentraci lysozymu v lyzačním roztoku pro lyzi bakteriálních buněk. Byly zvoleny tři různé koncentrace lysozymu v roztoku: 3 mg/ml, 5 mg/ml a 10 mg/ml. Doba působení lyzačního činidla byla 1 h při laboratorní teplotě. Poté byl k buněčné suspenzi přidán SDS (25 µl, 10%) a Proteináza K (5 µl, 100 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne.

Lyze byla provedena s bakteriálními kulturami:

Lactobacillus casei subsp. casei CCM 7088

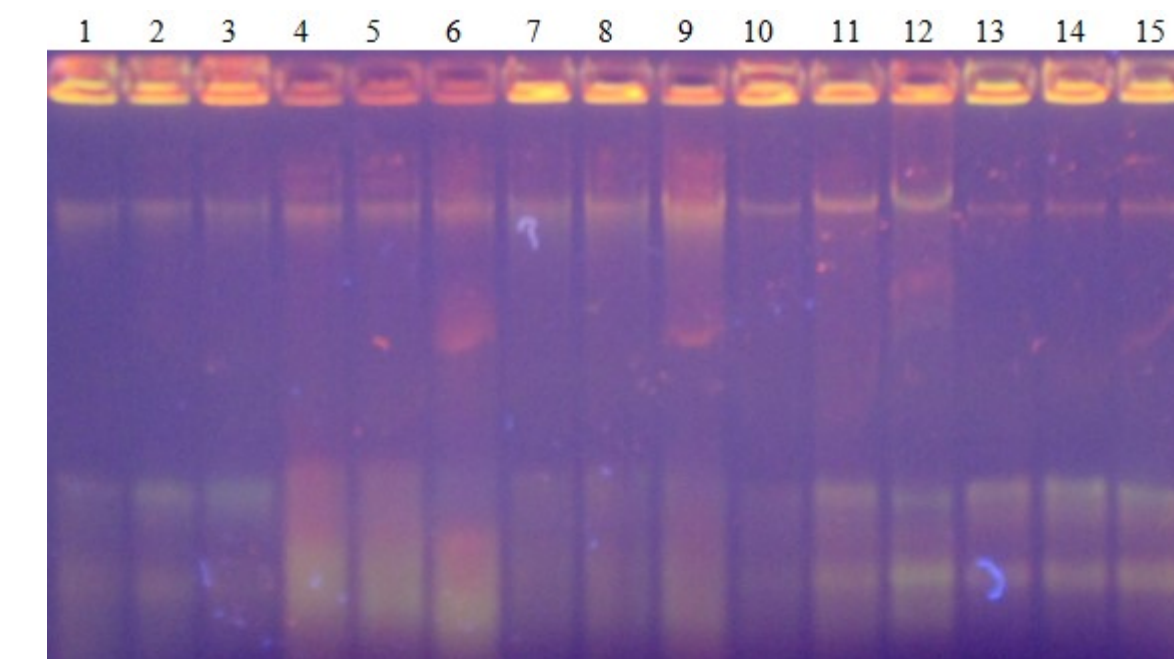
Lactobacillus fermentum CCM 7192

Lactobacillus paracasei subsp. paracasei CCDM 212/106

Lactobacillus plantarum CCM 7039

Lactobacillus rhamnosus CCM 1825

Buněčné lyzáty byly nanášeny na agarosový gel a byla provedena gelová elektroforéza. Gel byl obarven ethidium bromidem a DNA obsažená v buněčných lyzátech byla detekována pod UV světlem, *Obrázek 10*.



Dráha	Bakteriální kmen	Koncentrace lysozymu (mg/ml)	Přítomnost DNA
1	<i>Lactobacillus casei</i>	3	+
2	<i>subsp. casei</i>	5	+
3	CCM 7088	10	+
4		3	++
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5	++
6	CCM 7192	10	++
7		3	+
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5	++
9	CCM7039	10	+++
10	<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	+
11	<i>subsp. paracasei</i>	5	++
12	CCDM 212/106	10	++
13		3	+
14	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	5	+
15	CCM 1825	10	+

+, ++, +++ intenzita DNA v buněčných lyzátech

Obrázek 10: Agarosová gelová elektroforéza DNA v buněčných lyzátech buněk rodu *Lactobacillus*

Ve všech buněčných lyzátech byla prokázána přítomnost DNA. Vyšší množství DNA bylo detekováno u druhu *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus plantarum*, oproti vzorkům s *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*, kde bylo detekováno nižší množství DNA. Ze získaných buněčných lyzátů byla magneticky separována bakteriální DNA pomocí nosičů Fkol 135ox. Zároveň byla provedena fenol-chloroformová extrakce bakteriální DNA. U vzorků byla změřena koncentrace DNA pomocí spektrofotometru. Výsledky měření jsou uvedené v Tabulkách 15 a 16.

Tabulka 15: Hodnoty koncentrace DNA získané magnetickou separací z buněčných lyzátů připravených lyzačním roztokem o různé koncentraci lysozymu

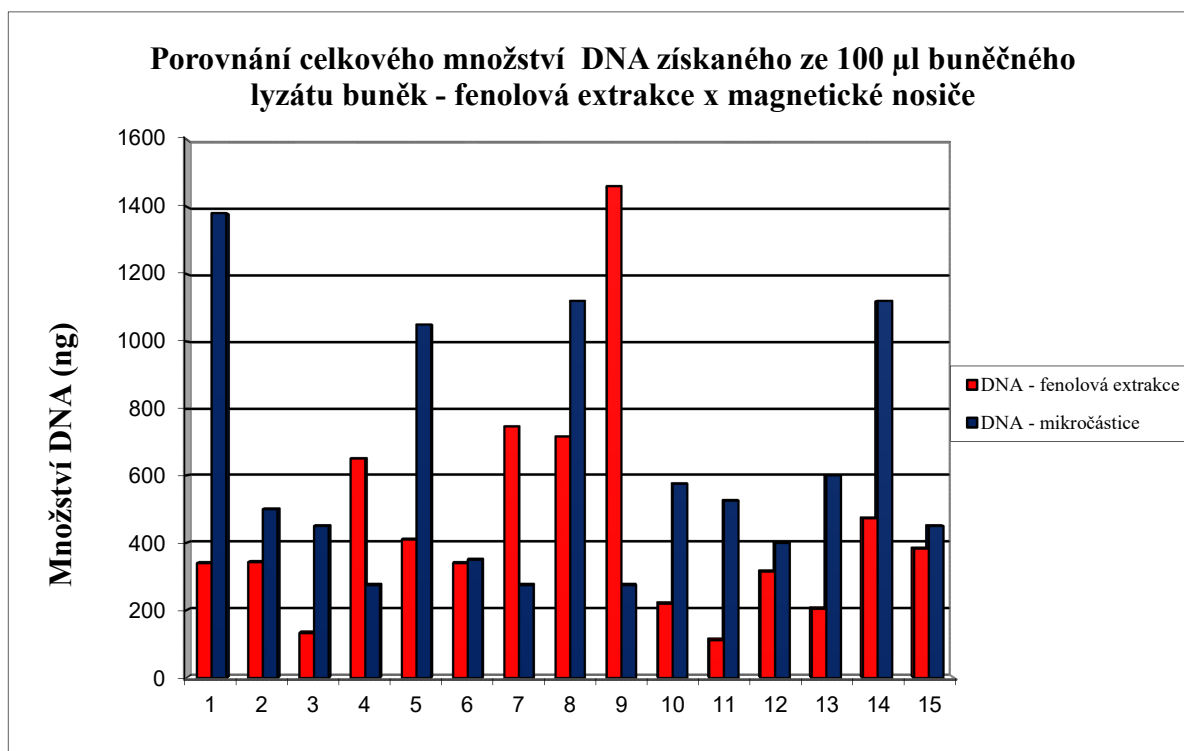
	Vzorek	Koncentrace lysozymu (mg/ml)	A ₂₆₀	A 260/280	c (µg/ml)
1	<i>Lactobacillus casei</i>	3	0,073	1,719	13,8
2	<i>subsp. casei</i>	5	0,025	1,250	5,0
3	CCM 7088	10	0,018	1,385	4,5
4	<i>Lactobacillus</i>	3	0,015	1,000	2,8
5	<i>fermentum</i>	5	0,054	1,400	10,5
6	CCM 7192	10	0,018	1,077	3,5
7	<i>Lactobacillus</i>	3	0,012	1,000	2,8
8	<i>plantarum</i>	5	0,065	1,324	11,2
9	CCM 7039	10	0,015	1,100	2,8
10	<i>Lactobacillus</i>	3	0,032	1,278	5,8
11	<i>paracasei</i>	5	0,029	1,313	5,3
12	<i>subsp. Paracasei</i> CCDM 212/106	10	0,200	1,143	4,0
13	<i>Lactobacillus</i>	3	0,041	1,200	6,0
14	<i>rhamnosus</i>	5	0,061	1,342	11,2
15	CCM 1825	10	0,020	1,200	4,5

Tabulka 16: Hodnoty koncentrace DNA získané fenol-chloroformovou extrakcí buněčných lyzátů připravených lyzačním roztokem o různé koncentraci lysozymu

	Vzorek	Koncentrace lysozymu (mg/ml)	A ₂₆₀	A _{260/280}	c (µg/ml)
1	<i>Lactobacillus casei</i>	3	0,153	1,143	34,0
2	<i>subsp. casei</i>	5	0,190	1,257	34,3
3	CCM 7088	10	0,091	1,082	13,3
4	<i>Lactobacillus</i>	3	0,271	1,065	65,3
5	<i>fermentum</i>	5	0,164	0,994	41,0
6	CCM 7192	10	0,140	1,162	34,0
7	<i>Lactobacillus</i>	3	0,312	0,931	74,8
8	<i>plantarum</i>	5	0,287	1,055	71,8
9	CCM 7039	10	0,656	1,449	146,0
10	<i>Lactobacillus</i>	3	0,100	0,967	22,0
11	<i>paracasei</i>	5	0,045	0,849	11,2
12	<i>subsp. paracasei</i> CCDM 212/106	10	0,134	1,235	31,5
13	<i>Lactobacillus</i>	3	0,082	0,962	20,5
14	<i>rhamnosus</i>	5	0,189	0,093	47,3
15	CCM 1825	10	0,153	1,055	38,3

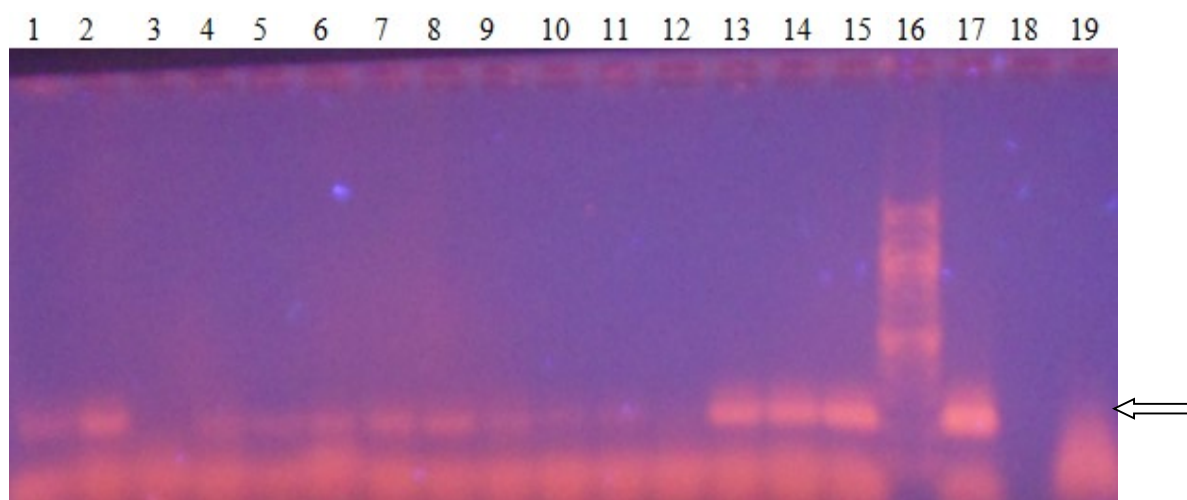
4.1.2.1 Srovnání množství DNA získané magnetickou separací a fenol – chloroformovou extrakcí

Na níže uvedeném *Obrázku 11* lze porovnat účinnost lysozymu o různé koncentraci v lyzačním roztoku u jednotlivých druhů laktobacilů. Na *Obrázku 11* je také uvedeno srovnání izolačních metod.



Obrázek 11: Srovnání izolačních metod

U vzorků DNA získaných magnetickou separací pomocí nosičů Fkol 135ox se podle Tabulky 15 a grafu uvedeném na Obrázku 11 jeví jako optimální koncentrace 5 mg/ml lysozymu v lyzačním roztoku pro druh *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus rhamnosus*. Pro druh *Lactobacillus paracasei* a *casei* byla optimální koncentrace lysozymu v lyzačním roztoku 3 mg/ml. Největší množství DNA separované magnetickými nosiči Fkol 135ox bylo naměřeno u druhů *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* a nejmenší množství u *Lactobacillus paracasei*. U fenol-chloroformové extrakce bylo naměřeno největší množství u vzorků *Lactobacillus plantarum* a nejmenší množství u *Lactobacillus paracasei* (Tabulka 16). Při přepočtu na 100 µl buněčného lyzátu bylo množství získané DNA pomocí magnetických nanočástic větší než množství DNA získané fenol-chloroformovou extrakcí. Při fenol-chloroformové extrakci jsou používány toxické organické látky jako fenol a chloroform, a proto byly další pokusy prováděny s magnetickými nanočásticemi. Získaná DNA byla amplifikována pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* v PCR. Výsledky reakce jsou uvedeny na Obrázcích 12 a 13.

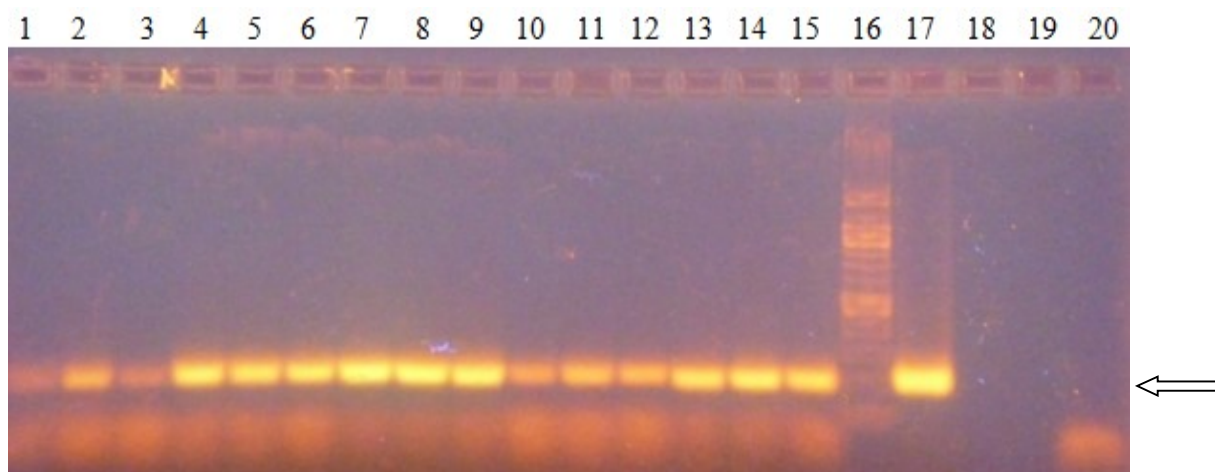


Dráha	Bakteriální kmen	Koncentrace lysozymu (mg/ml)	Intenzita PCR produktu
1	<i>Lactobacillus casei</i>	3	++
2	<i>subsp. casei</i>	5	+++
3	CCM 7088	10	-
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	3	++
5		5	+
6	CCM 7192	10	++
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	+++
8		5	+++
9	CCM 7039	10	+
10	<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	+
11		5	+
12	<i>subsp. Paracasei</i>		
12	CCDM 212/106	10	+
13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3	+++
14		5	+++
15	CCM 1825	10	+++
16	DNA standard 100 pb		
17	pozitivní kontrola		+++
18	prázdná dráha		
19	negativní kontrola		

++, +++ intenzita PCR produkt; - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 12: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (amplifikovaná DNA byla získána magnetickou separací). Podmínky PCR: primery specifické pro rod *Lactobacillus*

Téměř u všech vzorků DNA došlo k amplifikaci.



Dráha	Bakteriální kmen	Koncentrace lysozymu (mg/ml)	Intenzita PCR produktu
1	<i>Lactobacillus casei</i>	3	+
2	<i>subsp. casei</i>	5	++
3	CCM 7088	10	+
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	3	+++
5		5	+++
6	CCM 7192	10	+++
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	+++
8		5	+++
9	CCM 7039	10	+++
10	<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	++
11	<i>subsp. Paracasei</i>	5	++
12	CCDM 212/106	10	++
13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3	+++
14		5	+++
15	CCM 1825	10	+++
16	DNA standard 100 pb		
17	pozitivní kontrola		+++
18	prázdná dráha		
19	prázdná dráha		
20	negativní kontrola		

++, +++ intenzita PCR produkt; - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 13: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (amplifikovaná DNA byla získána fenol-chloroformovou extrakcí). Podmínky PCR: primery specifické pro rod *Lactobacillus*

Všechny PCR produkty byly detekovány.

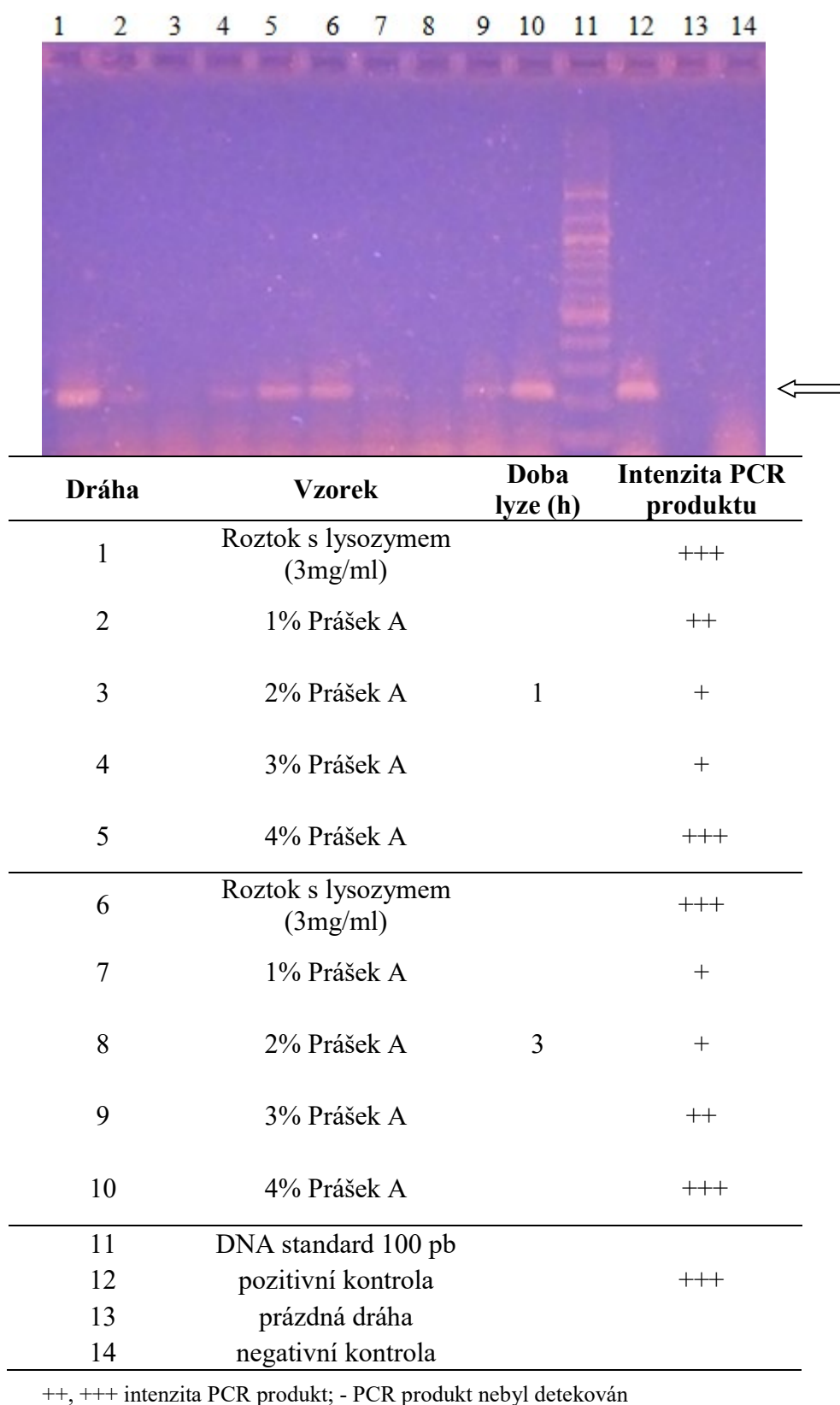
4.1.3 Testování enzymů obsažených v pracích prostředcích pro lyzi bakteriálních buněk a následná detekce izolované DNA metodou PCR

Cílem pokusu bylo otestovat vhodnost enzymů, obsažených v pracích práscích, pro lyzi bakteriálních buněk. Z pracího Prášku A byly připraveny lyzační roztoky o různé koncentraci (1%, 2%, 3% a 4% roztok). Jako kontrola byl použit lyzační roztok B s obsahem lysozymu 3 mg/ml. Byly lyzovány buňky kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212/106. Doba působení lyzačního roztoku na bakteriální buňky byla 1 h a 3 h. Při lyzi byl použit SDS a Proteináza K. Z buněčných lyzátů byla izolována DNA pomocí magnetických nosičů Fkol 135ox. Čistota a kvalita získané DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru (Tabulka 17).

Tabulka 17: Koncentrace bakteriální DNA získané z buněčných lyzátů připravených roztokem pracích prášků + kontrola (lyzační roztok s lysozymem)

Vzorek	Doba lyze (h)	A ₂₆₀	A _{260/280}	c (μg/ml)
1% Prášek A	1	1,161	1,43	58,1
2% Prášek A		0,451	1,41	22,5
3% Prášek A		0,172	1,79	8,6
4% Prášek A		0,073	1,87	3,7
Roztok B (3mg/ml)		1,555	1,43	77,7
1% Prášek A	3	1,234	1,43	61,7
2% Prášek A		0,574	1,25	28,7
3% Prášek A		0,604	1,22	30,2
4% Prášek A		0,556	1,63	27,8
Roztok B (3 mg/ml)		0,938	1,47	46,9

Získaná DNA byla použita jako matrice do PCR směsi. Byla provedena PCR reakce pro rod *Lactobacillus* – primery LbLMA a R16-1. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212/106 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí. PCR produkty byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy, viz. *Obrázek 14*.



*Obrázek 14: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů *Lactobacillus paracasei* – DNA byla amplifikována z buněčných lyzátů připravených pomocí roztoku pracího Prášku A*

Koncentrace DNA získaná po lyzi buněk byla vyšší u kontrolních vzorků, kde byl použit lysozym. Avšak DNA získaná z buněk pomocí roztoku pracího prášku A, byla v dostatečném množství a kvalitě vhodná pro metodu PCR. Nejintenzivnější PCR produkt byl detekován u vzorku, kde byl použit 4% roztok pracího prášku A s dobou trvání lyze 3 hod. Enzymy obsažené v pracím prášku A je možné využít pro lyzi bakteriálních buněk. Pro další pokusy byl použit 4% roztok pracího prášku jako lyzační činidlo.

4.1.4 Srovnání účinnosti pracích prostředků obsahujících enzymy pro lyzi bakteriálních buněk a následná detekce izolované DNA metodou PCR

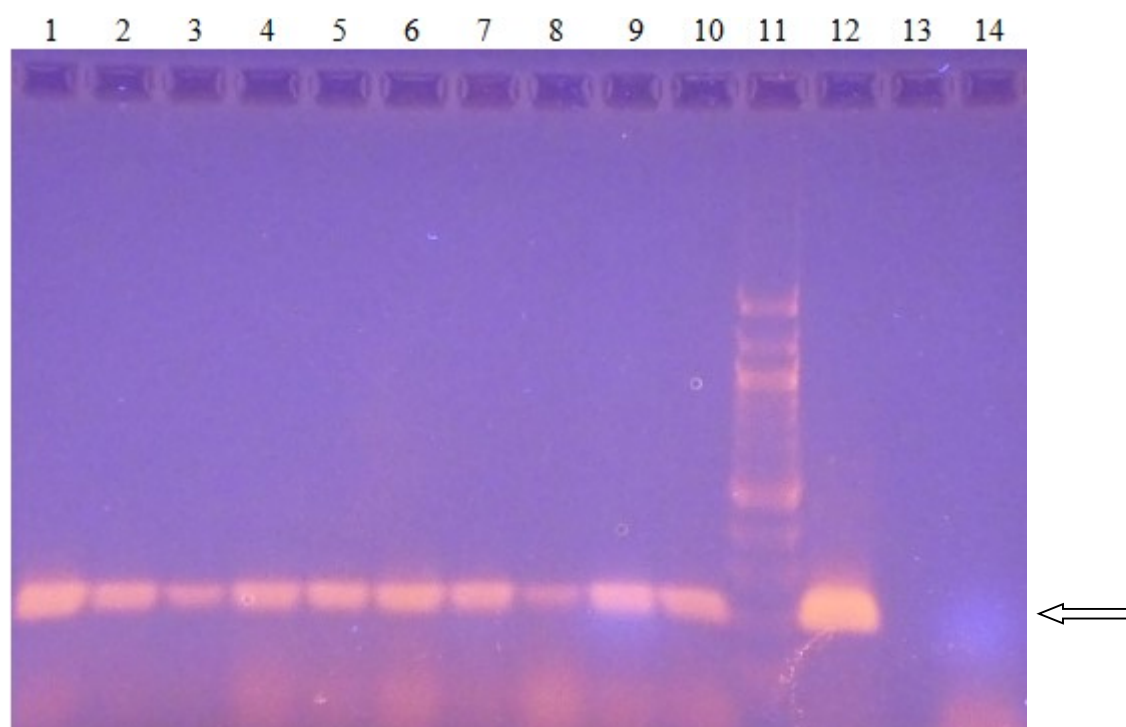
Cílem experimentu bylo najít nejvhodnější prací prostředek, který obsahuje enzymy, pro lyzi bakteriálních buněk. Bylo použito pět různých pracích prostředků, viz. Tabulka 4. Byly testovány jak sypké prací prostředky, tak tekuté gely. Z pracích prostředků byly namíchány 4% lyzační roztoky a doba lyze byla 1 a 3 h. Na konci lyze byl k suspensi přidán 20% roztok SDS a Proteináza K. Byly lyzovány buňky *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* CCDM 212/106. Ze získaných buněčných lyzátů byla magneticky separována DNA pomocí nosičů Fkol 135ox, jejíž množství a kvalita byla změřena spektrofotometrem, viz. Tabulka 18.

Tabulka 18: Koncentrace bakteriální DNA získané z buněčných lyzátů připravených roztokem pracích prostředků

Vzorek	Doba lyze (h)	A ₂₆₀	A _{260/280}	c (μg/ml)
4% Prášek A	1	0,078	1,49	- *
4% Prášek B		0,503	1,35	25,2
4% Prášek C		0,544	1,36	27,2
4% Prášek D		0,362	1,4	18,1
4% Prášek E		1,02	1,32	51
4% Prášek A	3	0,147	1,67	7,3
4% Prášek B		0,503	1,35	25,2
4% Prášek C		1,051	1,21	52,5
4% Prášek D		0,596	1,43	29,8
4% Prášek E		0,671	1,35	33,6

*příliš nízká koncentrace DNA

Z Tabulky 18 je patrné, že nejvyšší koncentrace DNA byly naměřeny u vzorků, kde pro lyzi buněk byl použit jako lyzační roztok Prášek C a Prášek E. Získaná DNA byla použita jako matrice při přípravě PCR směsi. Byla provedena PCR reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*. Získané PCR produkty byly detekovány na agarosové gelové elektroforéze, viz. Obrázek 15.



Dráha	Vzorek	Doba lyze (h)	Intenzita PCR produktu
1	4% Prášek A	1	+++
2	4% Prášek B		+++
3	4% Prášek C		++
4	4% Prášek D		+++
5	4% Prášek E		+++
6	4% Prášek A	3	+++
7	4% Prášek B		+++
8	4% Prášek C		++
9	4% Prášek D		+++
10	4% Prášek E		+++
11	DNA standard 100 pb		-
12	pozitivní kontrola		+++
13	prázdná dráha		
14	negativní kontrola		-

++, +++ intenzita PCR produkt; - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 15: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů Lactobacillus paracasei – DNA byla amplifikována z buněčných lyzátů připravených pomocí roztoků pracích prostředků

Z Obrázku 15 je patrné, že bakteriální DNA byla amplifikována u všech vzorků. Nejintenzivnější PCR produkty byly detekovány u vzorků, kde jako lyzační činidlo byl použit

roztok pracího prostředku Prášek A, Prášek B a Prášek E. Naopak nejméně intenzivní PCR produkt byl stanoven u vzorku, kde pro lyzi buněk byl použit roztok Prášku C. Příprava lyzačních roztoků z tekutých gelových pracích prostředků je snadnější než příprava lyzačních roztoků ze sypkých pracích prostředků. Proto byl pro další pokusy jako optimální lyzační činidlo zvolen 4% lyzační roztok Prášku E.

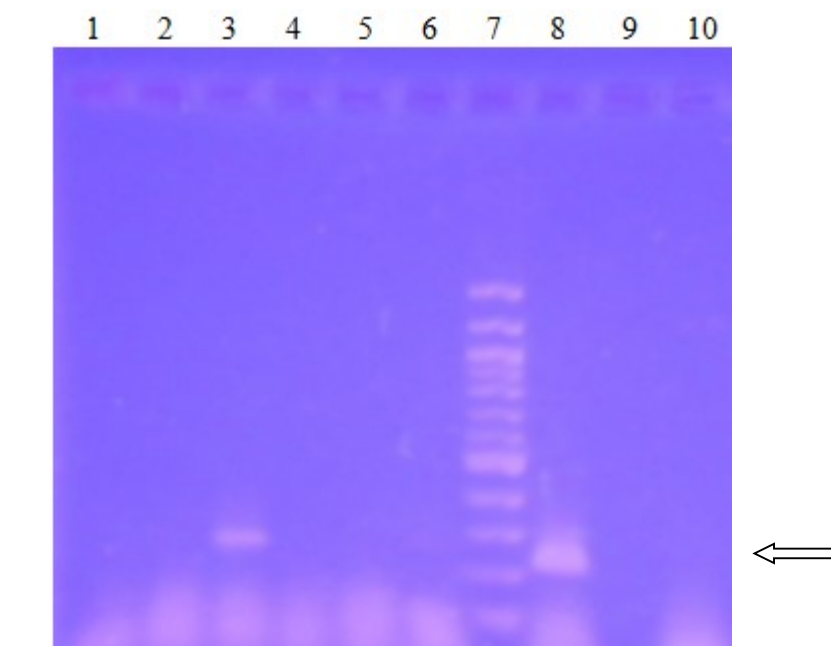
4.1.5 *Testování enzymů obsažených v pracích prostředcích pro lyzi bakteriálních buněk z potravinářských matric a následná detekce izolované DNA metodou PCR*

V experimentu byly použity potravinářské matrice: Acidofilní mléko – plnotučné (Mlékárny Valašské Meziříčí), Jogobella jogurt – příchut' mango (Zott) a Bílý jogurt (Madeta). Byly připraveny buněčné lyzáty působením 4% roztoku Prášku E. Ze získaných buněčných lyzátů byla magneticky separována DNA pomocí nosičů Fkol 135ox. Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometrem, Tabulka 19.

Tabulka 19: Koncentrace bakteriální DNA získané z potravinářských matric, buněčné lyzáty připravené roztokem Prášku E

Vzorek	Doba lyze (h)	A ₂₆₀	A _{260/280}	c (µg/ml)
Acidofilní mléko (Valašské Meziříčí)	1	1,281	1,31	64,1
Jogobella jogurt – mango (Zott)		1,297	1,42	64,9
Bílý jogurt (Madeta)		1,695	1,32	84,7
Acidofilní mléko (Valašské Meziříčí)	3	0,952	1,37	47,6
Jogobella jogurt – mango (Zott)		2,151	1,43	107,6
Bílý jogurt (Madeta)		0,856	1,3	42,8

Z Tabulky 19 je patrné, že nejvyšší koncentrace byla naměřena u vzorku ochuceného jogurtu Jogobella. Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* a PCR produkty byly detekovány na gelové agarosové elektroforéze, viz. *Obrázek 16*.



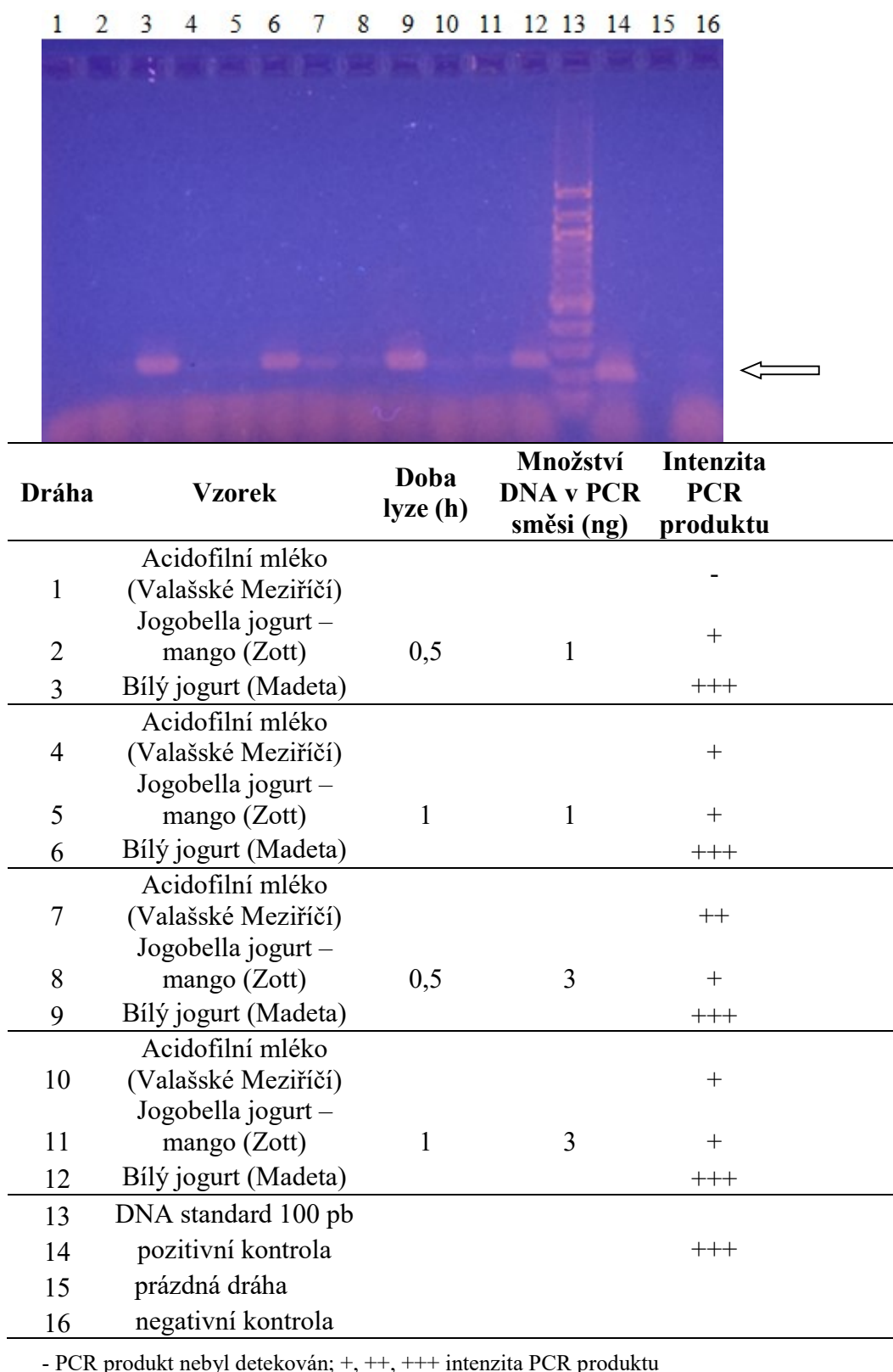
Dráha	Vzorek	Doba lyze (h)	Intenzita PCR produktu
1	Acidofilní mléko (Valašské Meziříčí)	1	-
2	Jogobella jogurt – mango (Zott)		-
3	Bílý jogurt (Madeta)		++
4	Acidofilní mléko (Valašské Meziříčí)	3	-
5	Jogobella jogurt – mango (Zott)		-
6	Bílý jogurt (Madeta)		-
7	DNA standard 100 pb		
8	pozitivní kontrola		+++
9	Prázdná dráha		
10	negativní kontrola		-

++, +++ intenzita PCR produkt; - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 16: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů získaných amplifikací DNA z potravinářských matric

Z Obrázku 16 je patrné, že PCR produkt byl detekován pouze u vzorku Bílého jogurtu (Madeta), kde doba působení lyzačního roztoku byla 1 h – dráha 3. Jelikož byl detekován pouze jeden PCR produkt, byl pokus zopakován s dobou působení lyzačního činidla 1 h a s dobou působení lyzačního činidla 30 min. Jako lyzační činidlo byl použit 4% roztoku Prášku E. Z buněčných lyzátů byla magneticky separována DNA pomocí nosičů Fkol 135ox.

Získaná DNA byla amplifikována v PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*. Do PCR směsi byl použit 1 ng a 3 ng DNA, viz. *Obrázek 17*.

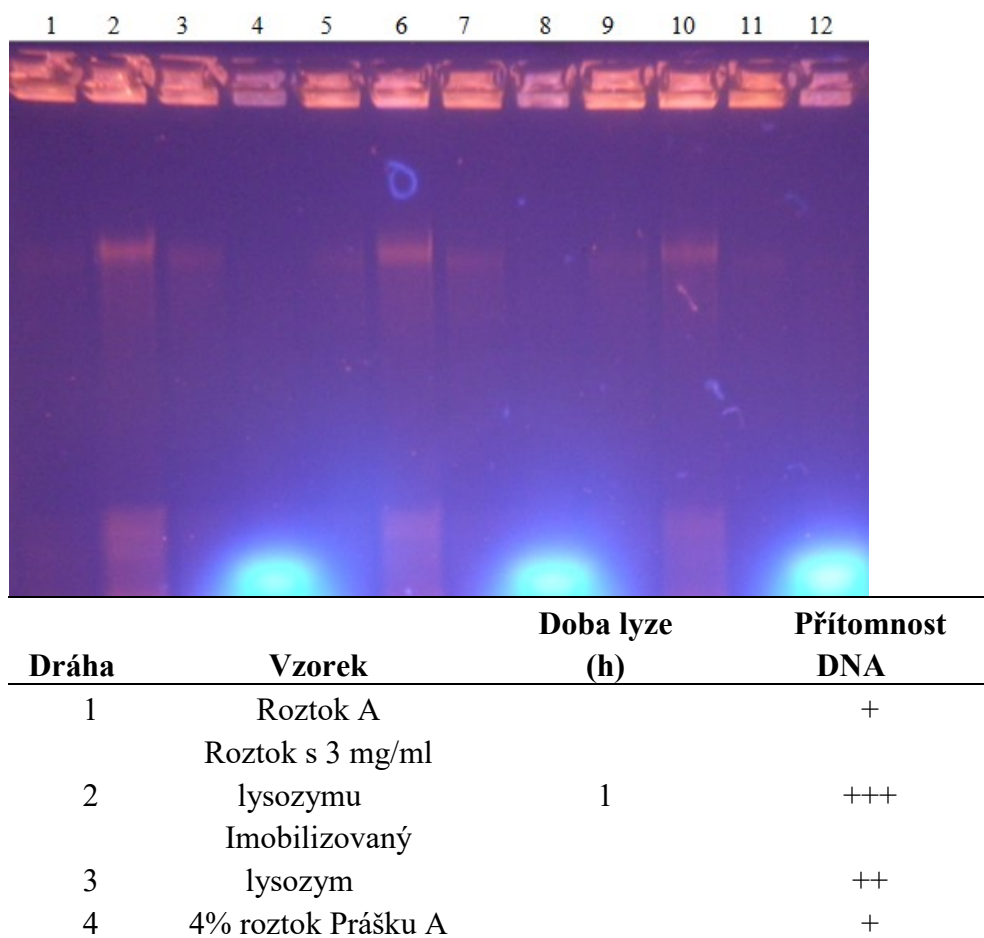


Obrázek 17: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů získaných amplifikací DNA z potravinářských matric - 1 ng a 3 ng DNA v PCR směsi

Nejintenzivnější PCR produkty byly u vzorků Bílého jogurtu (Madeta). U vzorků Acidofilního mléka (Valašské Meziříčí) a Jogobella jogurtu – mango (Zott) byly také detekovány PCR produkty, ale nižší intenzity. Z výsledku lze usoudit, že enzymy obsažené v pracích prostředcích lze použít pro lyzi bakteriálních kultur mléčných výrobků. Půl hodinová doba lyze byla dostačující. Při provedení PCR reakce je lepší použít směs s obsahem DNA 3 µl.

4.1.6 Srovnání různých metod lyze bakteriálních buněk a následná detekce izolované DNA metodou PCR

V tomto pokusu byly srovnány tři různé lyzační metody bakteriálních buněk *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* CCDM 212/106. Jako lyzační činidla byly použity: roztok s obsahem lysozymu 3 mg/ml, imobilizovaný lysozym a 4% roztok pracího Prášku A. Zároveň byla provedena lyze roztokem A, který neobsahuje lysozym. Tento roztok byl použit jako kontrola. Zároveň byla testována doba působení lyzačního činidla: 1 h, 3 h a 5 h. Získané buněčné lyzáty (15 µl) byly nanесeny na agarosový gel a byla provedena elektroforéza, *Obrázek 18*.



5	Roztok A		+
	Roztok s 3 mg/ml		
6	lysozymu	3	+++
	Imobilizovaný		
7	lysozym		++
8	4% roztok Prášku A		+
9	Roztok A		+
	Roztok s 3 mg/ml		
10	lysozymu	5	++
	Imobilizovaný		
11	lysozym		+
12	4% roztok Prášku A		-

+, ++, +++ intenzita DNA; - nepřítomnost DNA

Obrázek 18: Buněčné lyzáty získané různými lyzačními činidly

Z Obrázku 18 je patrné, že DNA o různé intenzitě byla detekována u téměř všech vzorků. Vyšší intenzita DNA byla detekována u vzorků, kde byl jako lyzační činidlo použit roztok s 3 mg/ml lysozymu, v porovnání se vzorky, kde byl použit imobilizovaný lysozym a 4% roztok Prášku A. U dráhy číslo 2, 6 a 10 lze pozorovat klesající intenzitu DNA. Z toho lze usoudit, že je lepší kratší doba působení lyzačního činidla (3 h).

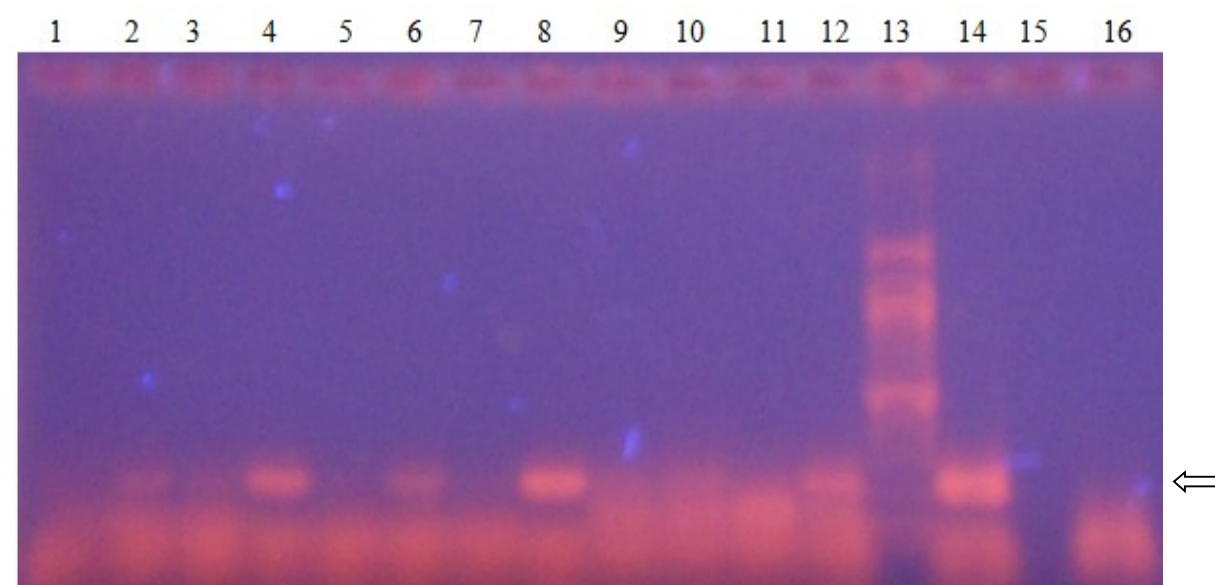
Z buněčných lyzátů byla izolovaná bakteriální DNA pomocí magnetických nosičů Fkol 135ox. Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometrem. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 20.

Tabulka 20: Hodnoty koncentrace DNA získané z buněčných lyzátů připravených různými lyzačními činidly

Vzorek	Doba lyze (h)	A ₂₆₀	A _{260/280}	c (μg/ml)
Kontrolní roztok A		0,485	1,410	-
Roztok s 3 mg/ml lysozymu	1	0,110	1,580	5,5
Imobilizovaný lysozym		0,102	1,340	5,1
4% roztok Prášku A		-0,537	1,370	
Kontrolní roztok A		0,150	1,290	7,5
Roztok s 3 mg/ml lysozymu	3	0,076	1,610	3,8
Imobilizovaný lysozym		0,061	1,080	3,0
4% roztok Prášku A		-0,299	1,290	-
Kontrolní roztok A		0,531	1,350	26,6
Roztok s 3 mg/ml lysozymu	5	0,514	1,420	25,7
Imobilizovaný lysozym		0,969	1,510	48,5
4% roztok Prášku A		-0,332	1,390	-

- Koncentrace DNA nebyla stanovena

Získaná DNA byla použita (1μl) jako matrice do PCR směsi. Byla provedena PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*, viz. *Obrázek 19*.



Dráha	Vzorek	Doba lyze (h)	Intenzita PCR produktu
1	Kontrolní roztok A	1	-
2	Roztok s 3 mg/ml lysozymu		++
3	Imobilizovaný lysozym		+
4	4% roztok Prášku A		+++
5	Kontrolní roztok A	3	-
6	Roztok s 3 mg/ml lysozymu		++
7	Imobilizovaný lysozym		-
8	4% roztok Prášku A		+++
9	Kontrolní roztok A	5	-
10	Roztok s 3 mg/ml lysozymu		++
11	Imobilizovaný lysozym		-
12	4% roztok Prášku A		++
13	DNA standard 100 bp		
14	pozitivní kontrola		+++
15	prázdná dráha		
16	negativní kontrola		

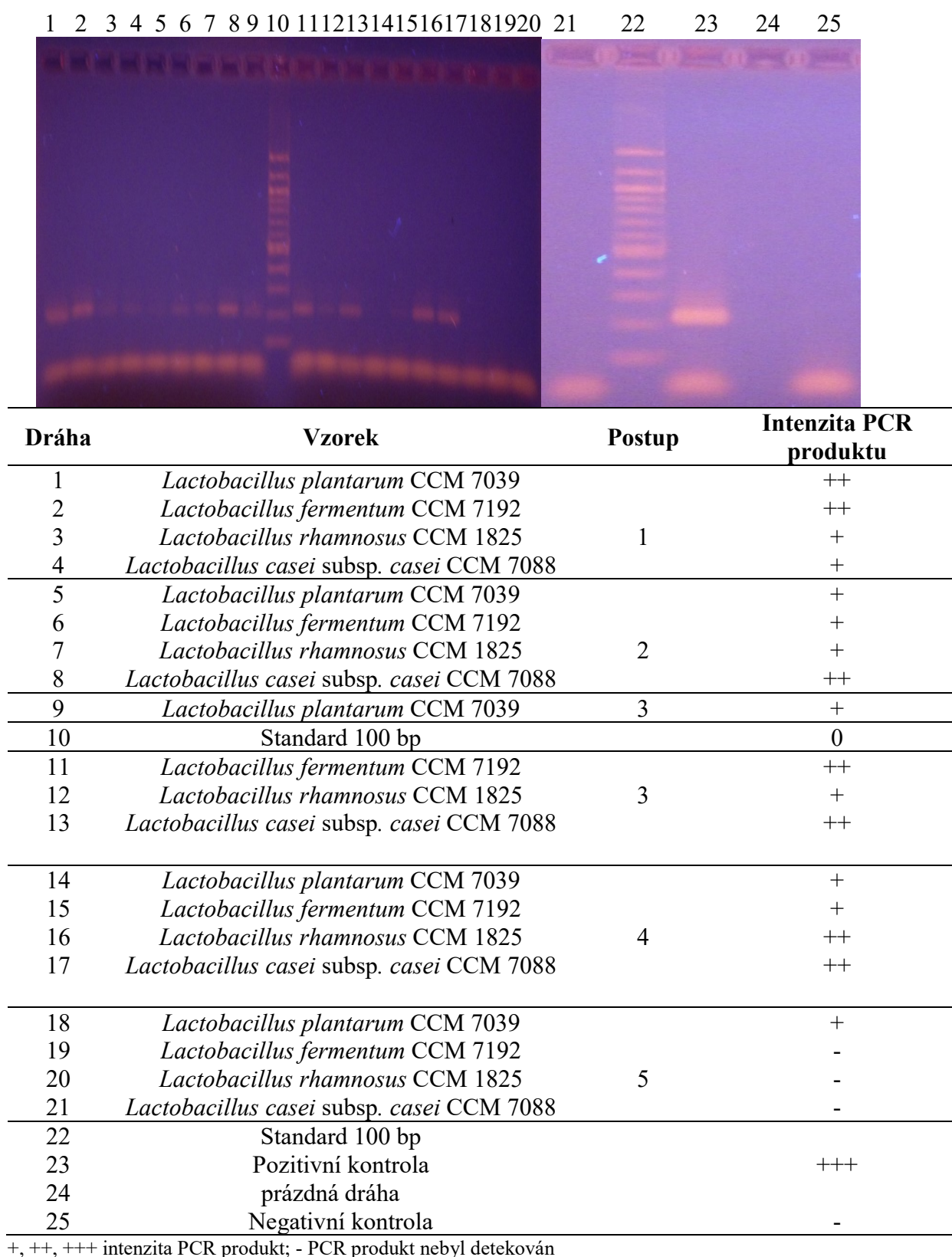
- PCR produkt nebyl detekován; +, ++, +++ intenzita PCR produktu

Obrázek 19: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů získaných amplifikací z DNA Lactobacillus paracasei CCDM 212/106, přičemž buněčné lyzáty byly připraveny působením různých lyzačních činidel

Nejintenzivnější PCR produkty byly detekovány u vzorků, kde byl pro lyzi buněk použit roztok Prášku A. Optimální doba působení lyzačního činidla byla stanovena na 3 hodiny. U vzorků, kde byl lyzačním činidlem roztok s lysozymem (3 mg/ml), byla optimální doba lyze také 3 hod. Při použití imobilizovaného lysozymu byla optimální doba lyze kratší, 1 hodina. Bylo vyhodnoceno, že při použití imobilizovaného lysozymu byl detekován PCR produkt pouze u dráhy č. 3. Proto bylo použití lyzačního činidla, imobilizovaný lysozym, vyhodnoceno jako málo efektivní a drahé.

4.2 Izolace DNA z buněk bakterií rodu *Lactobacillus* metodou vysolování

V tomto experimentu byly analyzované kmeny *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088. Při izolaci DNA byly testovány různé koncentrace NaCl (0,55 - 2,75 M). Po provedení celého postupu uvedeného v kapitole 3.13.3 byla získána DNA. Bakteriální DNA byla amplifikována pomocí PCR za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus*. Produkty PCR byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy. Velikost PCR produktů byla asi 250 bp (Obrázek 20).



Obrázek 20: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů získaných amplifikací izolované DNA

Výsledky agarosové gelové elektroforézy PCR produktů jsou uvedeny na *Obrázku 20*. Z *Obrázku 20* je patrné, že byla prokázána přítomnost produktů PCR, to znamená, že byla získána amplifikovatelná DNA (dostatečné množství DNA o vhodné kvalitě). Jako nejvhodnější koncentrace NaCl pro izolaci DNA byla zjištěna koncentrace 1,65 M a 2,2 M (postupy 3 a 4 - viz. Tabulka 10, kapitola 3.13.3). V těchto případech byly po amplifikaci DNA izolované ze všech testovaných bakteriálních druhů detekovány specifické produkty PCR (*Obrázek 20* - dráha č. 11-17). Při použití nižších koncentrací NaCl (0,55 a 1,10 M) byly detekovány PCR produkty nižší intenzity (*Obrázek 20* - dráhy č. 1-9). Postup 5 s 2,75 M NaCl byl vyhodnocen jako nejméně účinný, protože po amplifikaci DNA nebyly PCR produkty detekovány (*Obrázek 20* - dráhy č. 18-21). Z výsledků vyplývá, že pro lyzi bakteriálních buněk lze použít roztok pracího prášku. Metoda izolace DNA z lyzátu buněk vysolováním roztokem chloridu sodného se jeví jako vhodná pro lyzi buněk rodu *Lactobacillus*. Rozdíly v intenzitě PCR produktů získaných po amplifikaci DNA, izolované vysolováním stejnou koncentrací NaCl, mohou odrážet rozdíly v lyzi buněk pracím prostředkem. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdíly ve složení buněčných stěn testovaných druhů. Výsledky dosažené uvedenými postupy jsou srovnatelné s výsledky metod izolace DNA magnetickými nosiči či fenol-chloroformovou extrakcí. Výhodou této metody je skutečnost, že se nemusí pracovat s organickými toxickými látkami.

4.3 Optimalizace reakčních podmínek adsorpce a desorpce nukleových kyselin z P(HEMA-GMA)-NH₂ nosičů

V této kapitole byl testován vliv iontové síly pufrů při adsorpci nukleových kyselin na nosiče P(HEMA-GMA)-NH₂ a eluce nukleových kyselin do příslušného pufru z nosičů P(HEMA-GMA)-NH₂. Pro optimalizaci reakčních podmínek byla použita vysokomolekulární DNA izolovaná z kuřecích erythrocytů.

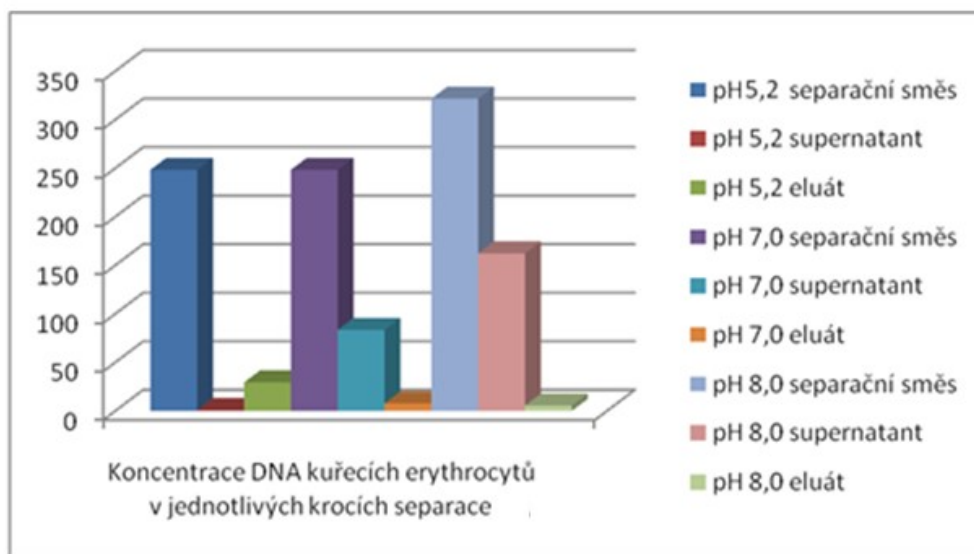
4.3.1 Testování reakčních pufrů Tris o různé hodnotě pH

V jednotlivých krocích separace DNA pomocí nosičů P(HEMA-GMA)-NH₂ byla sledována koncentrace DNA. Spektrofotometrické měření koncentrace DNA bylo prováděno na počátku izolace (v separační směsi), po odseparování nosičů (v supernatantu) a 24 h po přidání elučního roztoku k nosičům (v eluátu). Byly testovány Tris pufrы o hodnotách pH 5,2; 7,0; 7,6 a 8,0. Nejvyšší adsorpce DNA na nosiče byla zjištěna při použití Tris pufru o hodnotě pH 5,2 (*Obrázek 21*). Z důvodu vyšší adsorpce DNA na nosiče, lze vyvozovat i vyšší obsah DNA v elučním pufru. Z tohoto experimentu je patrné, že čím je nižší pH reakčního pufru (v rámci testované řady pH), tím je adsorpce DNA na magnetické nosiče vyšší.

Dále byly testovány koncentrace nosičů použitých do separační směsi – 2 mg/ml a 10 mg/ml, kdy nebyly zjištěny významné rozdíly. Jako eluční pufrы byly vybrány TE pufrы o hodnotách pH 7,8 a 9,0. V obou případech docházelo k eluci pouze minimálního množství

DNA, proto byl k elučním pufrům byl přidán KCl. Ani přidavek KCl neovlivnil množství DNA v elučním pufru.

Na *Obrázku 21* je zobrazen výsledek experimentu, kdy byly použity reakční pufrů: Tris pH 5,2; Tris pH 7,0 a Tris pH 8,0. Separační směs obsahovala P(HEMA-co-GMA)-NH₂ o hodnotě koncentrace 10 mg/ml a eluční pufr byl TE pufr pH 9,0 s 10 mM KCl. V Tabulkách 21 a 22 jsou uvedené hodnoty koncentrací DNA v jednotlivých krocích separace.



Obrázek 21: Porovnání koncentrací DNA (ng/μl) kuřecích erythrocytů v jednotlivých krocích magnetické separace, eluce do TE pufru pH 9,0 s přidavkem KCl

Tabulka 21: Koncentrace DNA kuřecích erythrocytů použité do separační směsi - Tris pufrů pH 7,0 a pH 8,0

Vzorek	c (ng/μl)	A ₂₆₀	A _{260/280}
pH 7,0*	251,0	1,019	1,844
pH 8,0	320,0	1,300	1,839

* Tato DNA byla použita i pro přípravu separační směsi s nosiči suspendovanými v Tris pufru pH 5,2

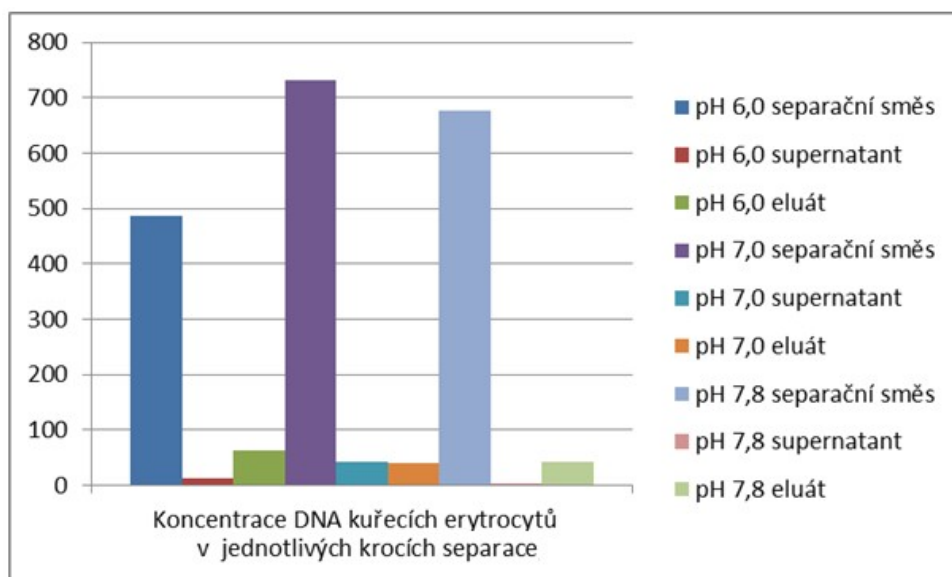
Tabulka 22: Hodnoty koncentrací DNA kuřecích erythrocytů v supernatantech a elučních pufrech – Tris pufry pH 5,2; 7,0 a 8,0

Vzorek	c (ng/μl)	A ₂₆₀	A _{260/280}
Supernat. pH 5,2	23,6	0,104	1,12
24 h po eluci pH 5,2	30,8	0,144	1,618
Supernat. pH 7,0	87,8	0,346	1,877
24 h po eluci pH 7,0	8,0	0,043	1,600
Supernat. pH 8,0	164,0	0,668	1,858
24 h po eluci pH 8,0	5,250	0,028	1,615

4.3.2 Testování reakčních fosfátových pufřů o různé hodnotě pH

Stejně jako v předešlém pokusu (kapitola 4.3.1) byly sledovány koncentrace DNA v jednotlivých krocích separace DNA pomocí nosičů P(HEMA-GMA)-NH₂. Cílem experimentu bylo zvolit optimální reakční pufr (fosfátové pufry o hodnotách pH 6,0; 7,0 a 7,8) pro adsorpci DNA na nosiče, eluční pufr (TE pH 7,8; TE pH 7,8 + 10mM KCl, TE pH 9,0 a TE pH 9,0 + 10mM KCl) a koncentraci nosičů (2 mg/ml a 10 mg/ml).

Na Obrázku 22 je uveden pokus, kdy pro adsorpci DNA na nosiče P(HEMA-co-GMA)-NH₂ (10 mg/ml) byly použity fosfátové pufry o hodnotách pH 6,0; 7,0 a 7,8 a jako eluční pufr byl zvolen TE pufru pH 9,0.



Obrázek 22: Porovnání koncentrace DNA kuřecích (ng/μl) erythrocytů v jednotlivých krocích separace, v prostředí fosfátového pufru pH 6,0; 7,0 a 7,8, eluce TE pufru pH 9,0

Z Obrázku 22 je patrné, že při separaci DNA došlo k adsorpci velkého množství DNA na polymerní nosiče P(HEMA-co-GMA)-NH₂. Nejvíce DNA se adsorbovalo na nosiče v prostředí fosfátového pufru o pH 7,8. V elučních roztocích byla ve všech případech naměřena pouze nízká koncentrace DNA. Z pokusu vyplývá, že fosfátový pufr o pH 7,8 je optimální pro adsorpci na nosiče P(HEMA-co-GMA)-NH₂. V Tabulkách 23 a 24 jsou uvedeny hodnoty koncentrací DNA v jednotlivých krocích separace.

Tabulka 23: Koncentrace DNA kuřecích erythrocytů použité do separační směsi - fosfátové pufrů pH 6,0; 7,0 a 7,8

Vzorek	c (ng/μl)	A ₂₆₀	A _{260/280}
pH 6,0	481,0	0,964	1,839
pH 7,0	729,0	1,450	1,846
pH 7,8	688,0	1,389	1,782

Tabulka 24: Hodnoty koncentrací DNA kuřecích erythrocytů v supernatantech a elučních pufrech – fosfátové pufrů pH 6,0; 7,0 a 7,8

Vzorek	c (ng/μl)	A ₂₆₀	A _{260/280}
Supernat. pH 6,0	12,5	0,023	1,923
24 h po eluci pH 6,0	63,0	0,195	1,482
Supernat. pH 7,0	42,0	0,085	1,826
24 h po eluci pH 7,0	36,5	0,093	1,521
Supernat. pH 7,8	-	-	-
24 h po eluci pH 7,8	42,5	0,121	1,491

- DNA nebyla detekována

Dále byly použity fosfátové pufrů o hodnotách pH 5,59; 5,91 a 6,24 pro adsorpci DNA na nosiče. Ve všech případech se na nosiče adsorbovalo více než 50 % původního množství DNA obsaženého v separační směsi. Přítomnost DNA v elučním roztoku nebyla detekována. Z výsledku lze vyvodit, že v rozmezí pH 5,59 – 6,24 se vlastnosti separace DNA nemění. Oproti předešlému pokusu, kde byly použity fosfátové pufrů o vyšším pH, lze konstatovat, že účinnost adsorpce DNA na polymerní nosiče P(HEMA-co-GMA)-NH₂ je nižší a následná eluce nulová. Jako optimální reakční pufr pro adsorpci DNA na nosiče byl zvolen fosfátový pufr o hodnotě pH 7,8.

Při sledování vlivu koncentrace nosičů na adsorpci DNA v příslušných reakčních pufrech nebyly pozorovány rozdíly. Rovněž rozdíly mezi použitím různých elučních pufřů nebyly zaznamenány.

4.5 Izolace DNA z mléčných výrobků

V této kapitole byly testovány vzorky mléčných výrobků s deklarovanou přítomností bakterií mléčného kvašení (Tabulka 25), které byly připraveny dle kapitoly 3.11. Bakteriální DNA byla izolována pomocí polymerních nosičů (P(HEMA-co-GMA)-NH₂, polyLYSINE (F79_L3)) v prostředí reakčních pufrů. Tato metoda byla srovnávána s izolací DNA pomocí nosičů (P(HEMA-co-GMA)-NH₂, polyLYSINE (F79_L3)) v prostředí PEG a NaCl a fenol-chloroformovou extrakcí DNA.

Tabulka 25: Přehled testovaných mléčných výrobků použitých pro izolaci bakteriální DNA pomocí magnetické separace částicemi P(HEMA-co-GMA)-NH₂

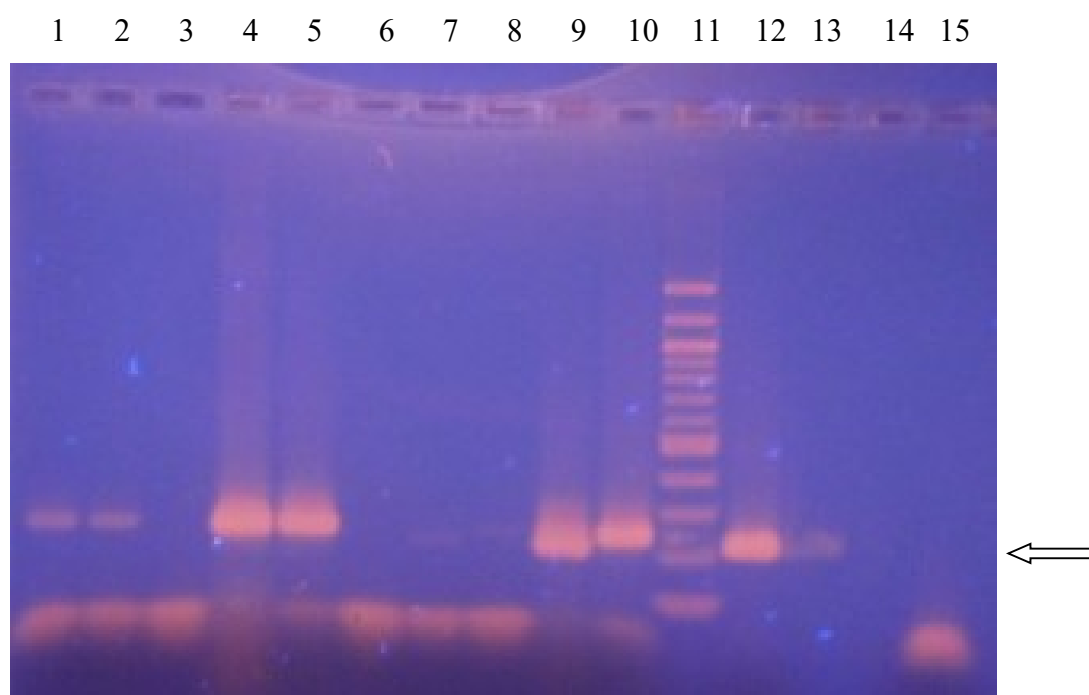
Typ mléčného výrobku	Mléčný výrobek
Bílý jogurt	Bílý jogurt z Valašska
	Smetanový bílý jogurt Kunín
	Klasik bílý jogurt OLMA
Tekuté mléčné výrobky	Actimel bílý
	Acidofilní mléko plnotučné
	Smetanový jogurt Florian – jahoda
Ochucené jogurty (jahodové)	Smetanový jogurt jahoda z Valašska
	Naše BIO jogurt jahodový

4.5.1 Testování nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ pro izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí fosfátového pufru pH 7,8

Pomocí polymerních nosičů (P(HEMA-co-GMA)-NH₂ (2 mg/ml) byla provedena separace bakteriální DNA v prostředí fosfátového pufru pH 7,8 z mléčných výrobků. Přítomnost získané DNA byla ověřena na gelové agarosové elektroforéze. DNA nebyla detekována. Bakteriální DNA byla použita jako matrice pro provedení PCR za použití primeru R16-1 a LbLMA. Po provedení několika experimentů bylo optimalizováno složení PCR směsi (Tabulka 26) a reakční podmínky. Zároveň byla připravena pozitivní kontrola s DNA získanou fenol-chloroformovou extrakcí z *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825 a negativní kontrola, kde DNA matrice byla nahrazena PCR vodou. Počet cyklů PCR byl navýšen na 35. Přítomnost PCR produktů je uvedena na *Obrázcích 23 a 24*.

Tabulka 26: Optimalizování složení PCR směsi pro rod *Lactobacillus*, 25 µl

Komponenty PCR směsi	Množství (µl)
PCR voda	9,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
dNTP směs (10 mM)	0,5
Primer LbLMA 1-rev (10 pmol/µl)	0,5
Primer R16-1 (10 pmol/µl)	0,5
Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/µl)	2,0
DNA matrice	10,0



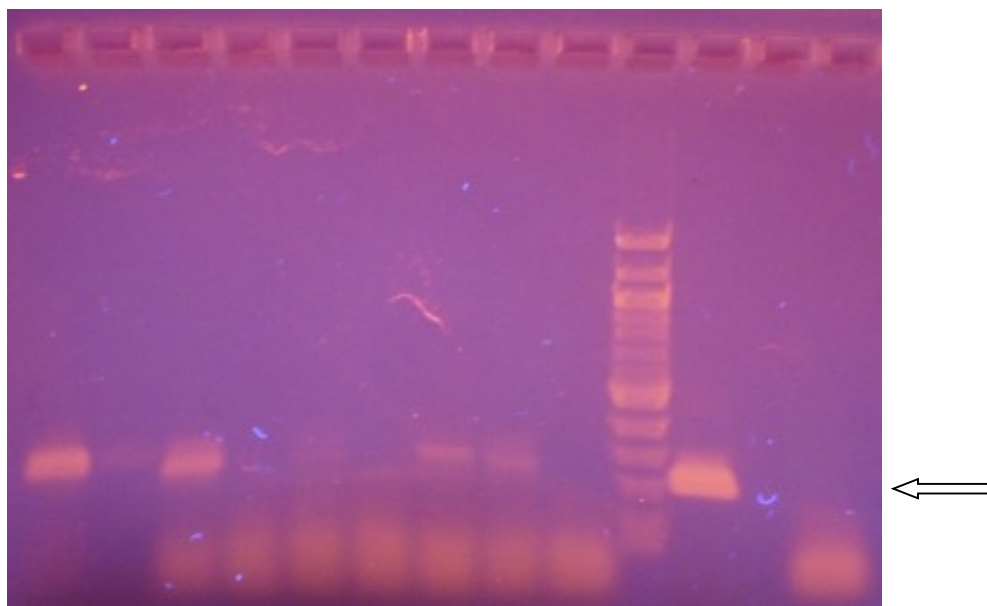
Dráha	Vzorek	Typ izolace	Přítomnost PCR produktu
1	Bílý jogurt z Valašska		++
2	Smetanový bílý jogurt Kunín	Nosiče <i>P(HEMA-co-GMA)-NH₂</i> – fosfátový pufr pH 7,8	++
3	Klasik bílý jogurt OLMA		-

4	Bílý jogurt z Valašska		+++
5	Smetanový bílý jogurt Kunín	fenol-chloroformová extrakce	+++
6	Klasik bílý jogurt OLMA		-
7	Actimel	Nosiče	+
8	Acidofilní mléko	<i>P(HEMA-co-GMA)-NH₂</i> – fosfátový pufr pH 7,8	+
9	Actimel bílý	fenol-chloroformová	+++
10	Acidofilní mléko		+++
11	Standard 100 bp		
12	pozitivní kontrola		+++
13	prázdná dráha		
14	prázdná dráha		
15	negativní kontrola		-

+, ++, +++ intenzita PCR produktu; - PCR produkt nebyl detekován

*Obrázek 23: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů vzorků bílých jogurtů a tekutých mléčných výrobků. DNA použita do PCR směsi byla získaná metodou separace pomocí nosičů *P(HEMA-co-GMA)-NH₂* v prostředí fosfátového pufru pH 7,8 a fenol-chloroformovou extrakcí DNA. Podmínky PCR: 10 ng DNA v PCR směsi, primery specifické pro rod *Lactobacillus*, 35 cyklů.*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Dráha	Vzorek	Typ izolace	Přítomnost PCR produktu
1	Smetanový jogurt Florian – jahoda		+++
2	Smetanový jogurt jahoda z Valašska	fenol-chloroformová	+
3	Naše BIO jogurt jahodový OLMA		+++
4	Smetanový jogurt Florian – jahoda		-
5	Smetanový jogurt jahoda z Valašska	Nosiče <i>P(HEMA-co-GMA)-NH₂</i> – fosfátový pufr pH 7,8	+
6	Naše BIO jogurt jahodový OLMA		-
10	Standard 100 bp		
11	pozitivní kontrola		+++
12	prázdná dráha		

13	negativní kontrola	-
----	--------------------	---

+, ++, +++ intenzita PCR produktu; - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 24: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů získaných amplifikací bakteriální DNA vzorků jahodových jogurtů. DNA byla získána fenol-chloroformovou extrakcí a pomocí nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ v prostředí fosfátového pufru pH 7,8

Separaci DNA pomocí nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ v prostředí fosfátového pufru pH 7,8 lze izolovat bakteriální DNA z mléčných výrobků. Získaná DNA je v kvalitě vhodné pro použití v PCR. Pomocí PCR byla potvrzena přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* v mléčných výrobcích: Bílý jogurt z Valašska, Smetanový bílý jogurt Kunín, Actimel, Acidofilní mléko - *Obrázku 23* a Smetanový jogurt jahoda z Valašska - *Obrázku 24*.

4.5.2 Testování nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ pro izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí PEG a NaCl

Druhou metodou byla separace bakteriální DNA z mléčných výrobků pomocí polymerních nosičů (P(HEMA-co-GMA)-NH₂ (2 mg/ml) v prostředí PEG a NaCl. Bakteriální DNA nebyla detekována na gelové agarosové elektroforéze. Se získanou bakteriální DNA byla provedena PCR (primery R16-1 a LbLMA). Složení PCR směsi a reakční podmínky byly stejné jako v kapitole 4.5.1 PCR produkty byly detekovány pouze u vzorků Klasik bílý jogurt OLMA

a Actimel. Intenzita PCR produktů byla velice nízká.

4.5.3 Testování nosičů polyLYSINE (F79_L3) pro izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí fosfátového pufru pH 7,8

Magnetické nosiče polyLYSINE (F79_L3) (2 mg/ml) byly použity pro separaci bakteriální DNA v prostředí fosfátového pufru pH 7,8 z mléčných výrobků. Získaná DNA byla použita jako matrice do PCR směsi (obsahující primery R16-1 a LbLMA). Proto byly vzorky ředěny elučním pufr (TE pufr pH 9,0) 10x. Za použití PCR směsi s nenaředenou DNA byly detekovány PCR produkty nízké intenzity pouze u vzorků Acidofilního mléka a Smetanového jogurtu Florian jahoda. Po amplifikaci naředené bakteriální DNA, která byla použita do PCR směsi, byly detekovány následující PCR produkty vzorků Bílého jogurtu z Valašska, Smetanového bílého jogurtu Kunín, Actimelu a Acidofilního mléka. Všechny detekované PCR produkty byly nízké intenzity. U ochucených jogurtů nebyly PCR produkty detekovány. Ve vzorcích, kde nedocházelo k amplifikaci DNA, se pravděpodobně nacházely inhibitory PCR.

4.5.4 Testování nosičů polyLYSINE (F79_L3) pro izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí PEG a NaCl

Magnetické nosiče polyLYSINE (F79_L3) byly použity pro separaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí PEG a NaCl. Získaná DNA byla amplifikována v PCR za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus*. PCR produkty byly detekovány pouze u vzorku Bílého jogurtu z Valašska. A to v případě použití DNA matrice – 10x naředěné bakteriální DNA i neředěné bakteriální DNA. U ostatních vzorků mléčných výrobků nebyly detekovány PCR produkty.

4.5.5 Fenol-chloroformová extrakce bakteriální DNA z mléčných výrobků

Z připravených buněčných lyzátů byla extrahována bakteriální DNA organickými činidly (fenol, chloroform). Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR. Výsledky jsou uvedené v kapitole 4.5.1. na *Obrázku 23 a 24*. Velmi intenzivní PCR produkty byly detekovány u vzorků Bílého jogurtu z Valašska, Smetanového bílého jogurtu Kunín, Actimelu, Acidofilního mléka – *Obrázek 23* a Smetanového jogurtu Florian jahoda a jahodového jogurtu Naše BIO OLMA – *Obrázek 24*. U vzorku Klasik bílý jogurt OLMA nebyl PCR produkt opět detekován.

4.5.6 Srovnání izolačních metod DNA ze vzorků mléčných výrobků

Po srovnání různých izolačních metod separace bakteriální DNA z mléčných výrobků byly zjištěny následující závěry. Při použití nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ ve fosfátovém pufru pH 7,8 byla separována bakteriální DNA z mléčných výrobků, která byla použita jako matrice do PCR směsi. PCR produkty byly detekovány u všech vzorků (*Obrázky 24 a 25*). Druhou metodou byla separace kondenzované DNA pomocí P(HEMA-co-GMA)-NH₂ v prostředí PEG a NaCl. Získané vzorky DNA byly amplifikovány pomocí PCR. U většiny vzorků nebyla prokázána přítomnost PCR produktů. Pouze u některých vzorků byly detekovány PCR produkty slabé intenzity. Pravděpodobně došlo k nespecifické sorpci malého množství bakteriální DNA na polymerní nosiče. Při použití nosičů polyLYSINE (F79_L3) v prostředí fosfátového pufru pH 7,8 byly získány PCR produkty nízké intenzity, a to pouze u některých vzorků mléčných výrobků. Separace bakteriální DNA z mléčných výrobků pomocí nosičů polyLYSINE (F79_L3) v prostředí PEG a NaCl byla vyhodnocena jako neúčinná, jelikož byl detekován PCR produkt pouze u jednoho vzorku. Poslední metodou byla fenol-chloroformová extrakce bakteriální DNA z mléčných výrobků. Rovněž tato DNA byla amplifikována v PCR. Při detekci na agarosové gelové elektroforéze byly na gelu PCR produkty vysoké intenzity (*Obrázky 24 a 25*).

Výhodou separace DNA pomocí nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ je omezení použití toxických organických rozpouštědel. Metodu separace DNA v prostředí fosfátového pufru lze

s výhodami použít pro detekci bakteriální DNA v mléčných výrobcích. Takto získaná DNA je vhodná pro amplifikaci pomocí PCR. PCR produkty byly dostatečné intenzity (Obrázky 24 a 25). Tato metoda je rychlá, jednoduchá a ekologická.

4.6 Bioinformatická analýza DNA mikroorganismů využívaných v potravinářském průmyslu

Pomocí softwaru Palindrom Analyser a G4Hunter byla provedena analýza výskytu sekundárních struktur DNA v genomu vybraných organismů, zejména významných v potravinářství.

4.6.1 Bioinformatická analýza výskytu kvadruplexových formací u vybraných bakterií využívaných v potravinářství

Součástí dizertační práce je přiložená publikace (Příloha 2), která se zabývá studiem přítomnosti a lokalizací PQS v doméně Bakteria. Z této studie byly vybrány bakteriální druhy, které se využívají v potravinářství. Pomocí softwaru G4Hunter byla provedena analýza výskytu kvadruplexů v genomu vybraných bakteriálních druhů. V Tabulce 27 jsou uvedené vybrané druhy pro analýzu DNA a velikosti chromozomů.

Tabulka 27: Vybrané druhy a velikosti chromozomů

Druh	Kmen	Sekvence (bp)
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	Firmicutes	2291220
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ZW3		2113023
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp, <i>paracasei</i> JCM 8130		2995875
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956		2098685
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG		3010111
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	Actinobacteria	2089645
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp, <i>lactis</i> DSM 10140		1938483
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20213 = JCM 1192		2269415

Byly zadány parametry analýzy: zobrazovací okno 25 a citlivost 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 a 2. Počty a frekvence nalezených kvadruplexů v genomu jsou uvedeny v Tabulce 28 a Tabulce 29.

Tabulka 28: Počet kvadruplexů v chromozomech vybraných bakteriálních druhů dle intervalů G4Hunter skóre

Druh	Počet PQS				
	1,2-1,4	1,4-1,6	1,6-1,8	1,8-2,0	2,0+
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	1488	25	1	0	0
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ZW3	169	1	0	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp, <i>paracasei</i> JCM 8130	753	9	0	0	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	3834	71	6	0	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	1011	8	0	0	0
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	1266	12	1	0	0
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp, <i>lactis</i> DSM 10140	1996	33	2	0	0
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20213 = JCM 1192	1915	25	1	0	0

Tabulka 29: Frekvence kvadruplexů v chromozomech vybraných bakteriálních druhů dle intervalů G4Hunter skóre

Druh	Frekvence PQS per 1000 bp				
	1,2-1,4	1,4-1,6	1,6-1,8	1,8-2,0	2,0+
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	0,6494	$10,9 \cdot 10^{-3}$	$0,4 \cdot 10^{-3}$	0	0
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ZW3	0,0800	0,5	0	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp, <i>paracasei</i> JCM 8130	0,2513	$3,0 \cdot 10^{-3}$	0	0	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	1,8269	$33,8 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	0	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	0,3359	$2,7 \cdot 10^{-3}$	0	0	0
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	0,6058	$5,7 \cdot 10^{-3}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$	0	0
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp, <i>lactis</i> DSM 10140	1,0297	$17,0 \cdot 10^{-3}$	0	0	0
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20213 = JCM 1192	0,8438	$11,0 \cdot 10^{-3}$	$0,4 \cdot 10^{-3}$	0	0

Největší počet potenciálních kvadruplexových struktur byl zjištěn v genomu *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 (3834 PQS) a nejmenší počet v genomu *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 (169 PQS) (Tabulka 28). Nejvyšší frekvence PQS byla zjištěna v genomu *Lactobacillus*

fermentum IFO 3956 – 1,8269 PQS/kbp a nejnižší frekvence PQS v genomu *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 – 0,0800 PQS/kbp (Tabulka 29).

4.6.2 Bioinformatická analýza genomu *Saccharomyces cerevisiae*

Byla provedena analýza výskytu IR a kvadruplexů v genomu *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), který obsahuje 16 chromozomů (Chr) a mitochondriální DNA (mtDNA). Dále byl sledován výskyt IR a kvadruplexů uvnitř a vně sekvencí anotovaných znaků. Velikosti Chr a mtDNA jsou uvedeny v Tabulce 30.

Tabulka 30: Velikosti chromozomů a mtDNA *S. cerevisiae*

Chromosom/mtDNA	Velikost sekvence (bp)
ChrI	230218
ChrII	813184
ChrIII	31662
ChrIV	1531933
ChrV	576874
ChrVI	270161
ChrVII	1090940
ChrVIII	562643
ChrIX	439888
ChrX	745751
ChrXI	666816
ChrXII	1078177
ChrXIII	924431
ChrXIV	784333
ChrXV	1091291
ChrXVI	948066
mtDNA	85779

Z Tabulky 30 je patrné, že nejdelší sekvenci má chromozom IV a nejkratší sekvenci mtDNA.

4.6.2.1 Analýza výskytu IR v genomu *Saccharomyces cerevisiae*

Pomocí Palindrome Analyseru byl stanoven počet nalezených IR a mtDNA v jednotlivých chromozomech, je uveden v Tabulce 31. Výsledky byly tříděny dle následujících parametrů: délka IR (Tabulka 32), velikost smyčky (Tabulka 33), a počet nespárovaných (párů) bází (Tabulka 34).

Tabulka 31: Počet nalezených IR, frekvence IR a nejdelší IR nalezený v jednotlivých chromozomech a mtDNA

Chromozom/mtDNA	Počet IR	IR/kbp	Nejdelší IR [bp]
I	96	0,42	16
II	476	0,59	23
III	262	0,83	29
IV	866	0,57	23
V	337	0,58	19
VI	172	0,64	16
VII	662	0,61	21
VIII	321	0,57	19
IX	253	0,58	18
X	392	0,53	20
XI	414	0,62	20
XII	602	0,56	24
XIII	448	0,48	18
XIV	418	0,53	22
XV	605	0,55	20
XVI	481	0,51	20
mtDNA	2146	25,02	23

Celkem bylo analyzováno 12 157 105 bp a bylo nalezeno 8 951 IR. Celková frekvence v genomu *S. cerevisiae* byla 0,74 IR/kbp. V mtDNA bylo nalezeno nejvíce IR (2146 IR), naopak nejméně v chromozomu I (96 IR). Nejvyšší frekvence výskytu IR byla nalezena u mtDNA (25,02 IR/kbp) a nejnižší u chromozomu I (0,42 IR/kbp).

Tabulka 32: Počet IR a frekvence IR v genomu *S. cerevisiae* dle délky IR

Velikost IR	Počet IR	IR/1000bp	Velikost IR	Počet IR	IR/1000bp
10	4610	0,3792	21	14	0,0012
11	2017	0,1659	22	10	0,0008
13	947	0,0779	23	4	0,0003
14	540	0,0444	24	1	0,0001
15	321	0,0264	25	0	0
16	187	0,0154	26	1	0,0001
17	73	0,0060	27	0	0
18	59	0,0049	28	0	0
19	35	0,0029	29	1	0,0001
20	27	0,0022	30	0	0

Tabulka 33: Počet IR a frekvence IR v genomu *S. cerevisiae* dle délky smyčky

Velikost IR	Počet IR	IR/1000bp	Velikost IR	Počet IR	IR/1000bp
0	2942	0,2731	6	554	0,0514
1	942	0,0875	7	537	0,0499
2	664	0,0616	8	542	0,0503
3	549	0,0510	9	534	0,0496
4	618	0,0574	10	523	0,0486
5	546	0,0507			

Tabulka 34: Počet IR a frekvence IR v genomu *S. cerevisiae* dle délky a počtu nespárovaných (párů) bází

Velikost IR	Počet IR	IR/1000bp
0	827	0,0768
1	8124	0,7542

S vzrůstající velikostí IR klesal jejich počet (Tabulka 32), třetina zcela postrádala smyčku (Tabulka 33). Z celkového množství nalezených IR byla jen zhruba desetina, neobsahující chybu sekvenční (Tabulka 34).

4.6.2.2 Analýza výskytu kvadruplexů v genomu *S. cerevisiae*

Pro analýzu výskytu PQS v genomu *S. cerevisiae* pomocí programu G4Hunteru byly zadány parametry: zobrazovací okno 25 a citlivost 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 a 2. Počty nalezených kvadruplexů v genomu, při různé citlivosti analýzy, jsou uvedeny v Tabulce 35.

Tabulka 35: Počet kvadruplexů a frekvence kvadruplexů v genomu *S. cerevisiae* dle citlivosti

Citlivost	Počet PQS	PQS/1000bp
1,2	3072	0,2852
1,4	1012	0,0940
1,6	230	0,0214
1,8	137	0,0127
2,0	53	0,0049

4.6.2.3 Analýza výskytu IR a kvadruplexů v oblastech anotovaných znaků

Byla provedena analýza výskytu IR a kvadruplexů uvnitř a v okolí sekvencí anotovaných znaků. Seznam anotovaných znaků je uveden v Tabulce 36. Nejčastěji popsaná sekvence „gene“, byla použita jako standard pro srovnání s jinými sekvencemi anotovaných znaků (Čechová a spol., 2017): *mRNA* (mediátorová RNA), *repeat_region* (repetitivní sekvence), *rep_origin* (počátek replikace), *tRNA* (transferová RNA), *ncRNA* (nekódující RNA), *centromere*, *mobile_element* (mobilní jednotka), *telomere* a *STS* (sequence-tagged site).

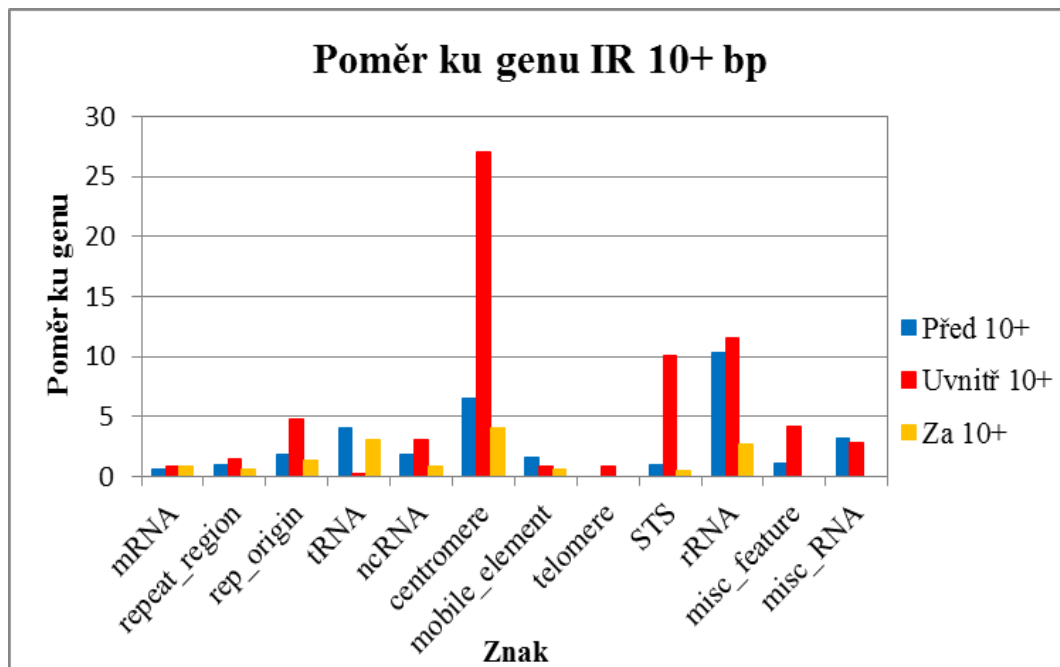
Tabulka 36: Seznam anotovaných znaků

Znak	Počet znaků	Velikost všech znaků (bp)	Průměrná velikost znaku
gene	6445	9026186	1400
<i>mRNA</i>	5995	8587452	1432
repeat_region	383	111937	292
rep_origin	360	107618	299
tRNA	299	19630	66
<i>ncRNA</i>	102	33448	328
centromere	64	3702	58
mobile_element	50	291801	5836
telomere	32	140679	4396
STS	17	7297	429
rRNA	14	15327	1095
misc_feature	14	12429	888
misc_RNA	10	16714	1671

Byl sledován výskyt IR o velikost 8 bp a delších, 10 bp a delších a 12 bp a delších. Počty a frekvence všech nalezených IR uvnitř a v okolí sekvencí anotovaných znaků, jsou uvedeny v Tabulce 37. Na *Obrázku 25* je uvedeno srovnání výskytu IR o velikost 10 bp a delších uvnitř a v okolí anotovaných znaků ku genu. Nejvyšší obohacení IR bylo zjištěno u centromer (uvnitř sekvence), dále pak rRNA (uvnitř sekvence a před sekvencí), STS (uvnitř sekvence) a rep_origin (uvnitř sekvence).

Tabulka 37: Počet IR a frekvence IR uvnitř a v okolí anotovaných znaků genomu *S. cerevisiae*

Feature	Počet IR			IR/1000bp		
	Před	Uvnitř	Za	Před	Uvnitř	Za
gene	20767	291098	32316	32,22	32,25	50,14
mRNA	18199	271609	29122	30,36	31,63	48,58
repeat_region	1532	4637	1712	40,00	41,43	44,70
rep_origin	1561	5055	1618	43,36	46,97	44,94
tRNA	1591	727	1752	53,21	37,04	58,60
ncRNA	412	1217	447	40,39	36,38	43,823
centomere	598	608	706	93,44	164,24	110,31
mobile_element	243	9870	211	48,60	33,82	42,20
telomere	121	4020	13	37,81	28,58	4,06
STS	57	336	58	33,53	46,05	34,12
rRNA	87	808	54	62,14	52,72	38,57
misc_feature	49	379	48	35,00	30,49	34,29
misc RNA	24	506	44	24,00	30,27	44,00

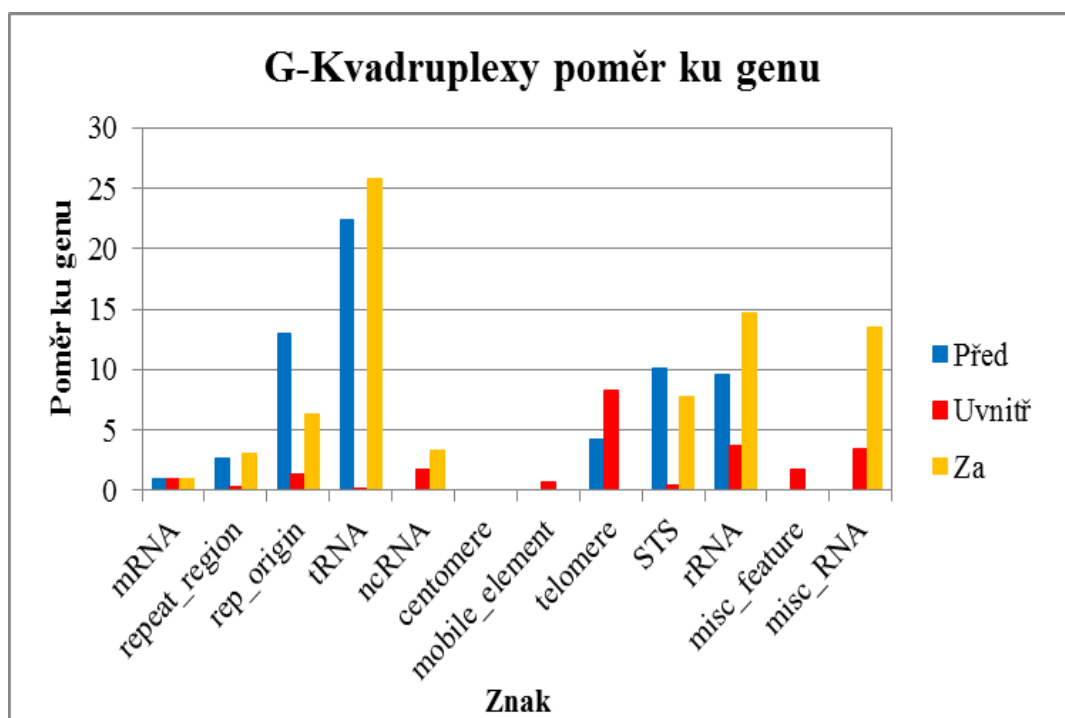


Obrázek 25: Srovnání frekvence IR o velikost 10 bp a delších uvnitř a v okolí anotovaných znaků ku genu

Dále byl sledován výskyt kvadruplexů uvnitř a v okolí sekvencí anotovaných znaků. Byly zvoleny podmínky pro citlivost analýzy: 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 a 2. Počty a frekvence všech nalezených PQS uvnitř a v okolí sekvencí anotovaných znaků jsou uvedeny v Tabulce 38. Na *Obrázku 26* je uvedeno srovnání výskytu PQS uvnitř a v okolí anotovaných znaků ku genu pro všechny nalezené PQS.

Tabulka 38: Počet kvadruplexů a frekvence kvadruplexů uvnitř a v okolí anotovaných znaků genomu *S. cerevisiae*

Feature	Počet PQS			PQS/1000bp		
	Před	Uvnitř	Za	Před	Uvnitř	Za
gene	123	2494	160	0,01	0,28	0,02
mRNA	114	2395	142	0,01	0,28	0,02
repeat_region	4	8	6	0,04	0,07	0,05
rep_origin	19	42	12	0,18	0,39	0,11
tRNA	6	1	9	0,31	0,05	0,46
ncRNA	0	16	2	0	0,48	0,06
centomere	0	0	0	0	0	0
mobile_element	0	54	0	0	0,19	0
telomere	8	321	0	0,06	2,28	0
STS	1	1	1	0,14	0,14	0,14
rRNA	2	16	4	0,13	1,04	0,26
misc_feature	0	6	0	0	0,48	0
misc RNA	0	16	4	0	0,96	0,24



Obrázek 26: Srovnání frekvence PQS uvnitř a v okolí anotovaných znaků ku genu pro všechny nalezené PQS

Nejvyšší výskyt kvadruplexových struktur byl zaznamenán v okolí sekvence tRNA, rep_origin (v okolí sekvence), rRNA (v okolí i uvnitř sekvence), viz. Obrázek 26. Velké množství kvadruplexů bylo zaznamenáno také před a uvnitř sekvencí telomer, STS (v okolí sekvence) a misc_RNA (uvnitř a za sekvencí).

DISKUZE

Dizertační práce se zabývá pěti tematickými okruhy.

První část byla věnována přípravě buněčných lyzátů z buněk rodu *Lactobacillus*. Rod *Lactobacillus* patří do skupiny mléčných bakterií. Bakterie mléčného kvašení jsou rozmanitou skupinou grampozitivních, aerotolerantních bakterií, které nevytvářejí spory (Martín-Platero a spol., 2007). Hlavním výsledným produktem fermentace glukózy je kyselina mléčná, která u homofermentativních mléčných bakterií poskytuje dvě molekuly kyseliny mléčné, zatímco heterofermentativní mléčné bakterie konvertují glukózu na směs oxidu uhličitého, ethanolu a kyseliny mléčné (Keles a spol., 2011). Mléčné bakterie lze nalézt v různých ekosystémech souvisejících s potravinami, včetně rostlinných materiálů a tradičních fermentovaných potravin (Alexander a spol., 2019). Molekulární detekce mikroorganismů vyžaduje uvolnění DNA z buněk (De Bruin a spol., 2019).

V této práci byly použity pro lyzi buněk lyzační činidla: roztok obsahující lysozym, imobilizovaný lysozym a roztok pracího prostředku. Lysozym je široce používán k narušení buněčné stěny bakteriálních buněk (Borrero-De Acuña a spol., 2017). Lysozym je enzym (N-acetylmuramid glykanhydroláza), který hydrolyzuje 1,4-vazby mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminovými zbytky v peptidoglykanu (Borrero-De Acuña a spol., 2017). Hydrolýza destabilizuje stěnu bakteriálních buněk, vyvolává osmotickou nerovnováhu a nakonec vede k buněčné lýzi (Nash a spol., 2006).

V nedávno publikované práci bylo poprvé prokázáno, že imobilizovaný lysozym může účinně odstraňovat lipopolysacharidy u *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* (Levashov a spol., 2019). Při použití imobilizovaného enzymu u buněk rodu *Lactobacillus* byla optimální doba působení lyzačního činidla kratší (1 hod), oproti použití lysozymu v roztoku (3 hod). Při delší době působení imobilizovaného lysozymu nebyla získána DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Oproti běžnému lyzačnímu činidlu obsahujícím lysozym se jevil imobilizovaný lysozym jako dražší a méně efektivní varianta pro buněčnou lyzi.

Jako poslední lyzační činidlo byly testovány prací prostředky obsahující enzymy. Prací prostředky obsahují enzymy a detergenty, které rozruší buněčnou stěnu a způsobí prasknutí cytoplazmatické membrány (Nash a spol., 2006). Při přípravě lyzačních roztoků se lépe pracuje s tekutými gely než se sypkými pracími prostředky. Prací prostředky lze použít nejen pro lyzi bakteriálních buněk čistých buněčných kultur, ale lze je aplikovat i na reálné vzorky – mléčné výrobky. Použití pracích prostředků pro lyzi buněk se jeví jako efektivní, levná varianta, kdy během lyze nemusí být přidávány další enzymy a detergenty. Získaná DNA je v dostatečném množství a kvalitě vhodné pro PCR. Pokud lyze byla prováděna pomocí roztoků pracího prostředku, nebylo zapotřebí použití přídavku Proteinázy K a SDS.

Druhá část dizertační práce se zabývá alternativní metodou izolace nukleových kyselin z bakteriálních buněk – vysolování bakteriální DNA. Tato metoda byla poprvé popsáné Millerem a spolupracovníky (Miller a spol., 1988).

Jedna z překážek, s nimiž se při extrakci DNA z velkého počtu vzorků setkáváme, je těžkopádný způsob deproteinizace buněčných lyzátů nebezpečnými organickými rozpouštědly jako je fenol a isochloroform (Miller a spol., 1988). Pro zjednodušení deproteinizačního postupu byla vyvinuta levná metoda (Tu a spol., 2018), která zahrnuje vysolení z buněčných lyzátů proteiny dehydratací a precipitací pomocí roztoku NaCl (Miller a spol., 1988). Tuto metodu lze použít i pro izolaci nukleových kyselin z eukaryotických buněk (krevních buněk) (Kalousová a spol., 2017)

V této práci byly testovány různé koncentrace NaCl, které působily na buněčné lyzáty, získané z čistých bakteriálních kultur rodu *Lactobacillus* působením roztoku pracího prostředku. Bakterie mléčného kvašení a další gram-pozitivní bakterie mohou přinášet problémy při lyzi způsobené jejich kompaktní strukturou buněčné stěny (Martín-Platero a spol., 2007). Jako nejvhodnější koncentrace NaCl pro izolaci DNA byla zjištěna koncentrace 1,65 M a 2,2 M. Získaná DNA byla v dostatečném množství a kvalitě vhodné pro provedení PCR. DNA získaná touto jednoduchou technikou poskytla množství srovnatelná s množstvím získaným z fenol-chloroformové extrakce (Miller a spol., 1988).

Jedná se o jednoduchou metodu, pomocí které lze získat velmi čistý preparát genomu DNA z několika typů prokaryotických buněk (Martín-Platero a spol., 2007). Tato izolační metoda je oproti běžně využívané fenol-chloroformové extrakci DNA šetrná k životnímu prostředí, jelikož nepoužívá toxické organické látky. Také z ekonomického hlediska je tato metoda výhodnější, zejména když se ještě pro přípravu buněčných lyzátů využije jako lyzační činidlo roztok pracího prostředku. Získané výsledky byly publikovány v Mlékařských listech – Příloha 1.

Třetí část práce je věnována studiu vlivu iontové síly při separaci nukleových kyselin pomocí nosičů. V biologických a nanotechnologických experimentech jsou pro získání reprodukovatelných výsledků kritické kroky: extrakce nukleových kyselin, purifikace nukleových kyselin a skladování nukleových kyselin (Tateishi-Karimata a Sugimoto, 2018).

Izolace DNA pomocí nosičů je oblastí, která má velký význam v biotechnologickém a molekulárně biologickém výzkumu (Haddad a spol., 2017). Polymerní nosiče, díky svým unikátním vlastnostem a schopnostem interagovat s různými molekulami, se staly velmi atraktivní v řadě medicínských oblastí převážně pro své různorodé využití (Trachtová a spol., 2016). Mohou se využívat například pro cílený transport léků (Mody a spol., 2014), magneticky indukovanou hypotermii (terapeutickou léčbu nádorů teplem vytvořeným pomocí magnetu) (Kaman a spol., 2011), magnetickou extrakci proteinů (Chen a spol., 2014), jako nosiče pro enzymatickou katalýzu (Horák a spol., 2007), jako biosensory (de la Escosura-Muñiz a spol., 2015) a dále v oblasti analytické chemie (Aguilar-Arteaga, a spol., 2010). Nosiče musí mít jednotnou velikost, dobrou stabilitu a povrch bohatý na aktivní funkční skupiny (Gong a spol., 2009). Důležitý je také povrchový náboj částice, která hraje hlavní roli v elektrostatickém vázání materiálů, jako je DNA (Haddad a spol., 2017).

Separace DNA pomocí nosičů se skládá z několika kroků. Adsorpce nukleové kyseliny na nosič, přečištění vzorku a desorpce nukleové kyseliny z magnetického nosiče do elučního

roztoku. Cílem této práce bylo zvýšení efektivity adsorpce nukleových kyselin na nosiče a desorpce nukleových kyselin z nosičů do elučního roztoku. V této práci byly testovány Tris pufrы o různých hodnotách pH pro adsorpci DNA na polymerní nosiče. Bylo zjištěno, že k vyšší adsorpci nukleových kyselin na polymerní nosiče dochází v Tris roztoku o nižším pH. Se zvyšujícím se pH se adsorpce nukleových kyselin na nosiče P(HEMA-co-GMA)-NH₂ snižuje. V dřívějších studiích bylo zjištěno, že přibližně 90% aminoskupin navázaných na chitosanové částice je protonizováno při pH 5,5 – 5,7 (*Mao a spol., 2001; Manchanda a spol., 2010*). Dále byly testovány fosfátové reakční pufrы pro adsorpci nukleových kyselin na polymerní nosiče o různých hodnotách pH. Fosfátový reakční pufr, pro adsorpci nukleových kyselin na nosiče, o hodnotě pH 7,8 byl vyhodnocen jako nejúčinnější. Docházelo k vysoké adsorpci DNA na nosiče P(HEMA-co-GMA)-NH₂. Pro desorpci nukleových kyselin z nosičů byly použity eluční pufrы: TE pufr o různých hodnotách pH s/bez přidavku KCl. Mezi jednotlivými elučními pufrы nebyly zaznamenány větší rozdíly.

DNA extrahovaná jinými metodami může obsahovat inhibitory PCR, včetně lipidů, polyfenolů a polysacharidů, čímž se zabrání amplifikaci pomocí PCR (*Pacheco Coello a spol., 2017*). Extrahovaná DNA z některých vzorků může vykazovat nízkou koncentraci a DNA nemůže být vizualizována na agarosovém gelu (*Peano a spol., 2004*). Avšak DNA získaná separací pomocí nosičů je v dostatečném množství a v kvalitě vhodné pro provedení PCR.

Čtvrtá část dizertační práce se zabývá různými typy magnetické separace DNA aplikované na reálné vzorky – mléčné výrobky obsahující probiotické kultury: magnetická separace DNA v prostředí reakčního pufru a magnetická separace kondenzované DNA v prostředí PEG a NaCl. Probiotika jsou popsána jako „živé mikroorganismy, které po požití v určitém množství přinášejí zdravotní přínosy nad rámec základní výživy“ (*Guarner a Schaafsma, 1998; Auty a spol., 2001*). Shromažďování klinických důkazů intestinálních izolátů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* podporujících zdraví, vedlo ke zvýšení komerčního zájmu o vývoj nových probiotických potravinářských produktů (*Auty a spol., 2001*).

Princip magnetické separace kondenzované DNA v prostředí PEG a NaCl je založen na chemických vlastnostech jednotlivých látek - hydrofobicita a hydrofilita jednotlivých komponent a jejich vzájemných interakcích (*Persson a spol., 2000*).

Polyethylenglykol je netoxický a biokompatibilní, proto je využíván v biomedicínských aplikacích pro cílenou dopravu léčiv v organismu nebo v tkáňovém inženýrství (*Prnka, a Šperlink, 2006*).

Při srovnání separačních metod byly pro izolaci DNA z mléčných výrobků testovány nosiče P(HEMA-co-GMA)-NH₂ a F79/L3 poly-LYSINE.) Poly-LYSINE nanočástice byly vyvinuty precipitací Fe (II) a Fe (III) solí hydroxidem amonným a oxidací výsledného magnetitu s chlornanem sodným a následovaným přidáním roztoku poly (L-lysin) (*Babič a spol., 2008*). V dřívějších studiích byly tyto magnetické nanočástice použity k adsorpci buněk, která byla velmi vysoká (více než 92%) (*Babič a spol., 2008*). Buněčné adsorpce na oxid železitý modifikovaný poly (L-lysinem) byly usnadněny jeho interakcí se záporně nabitým buněčným povrchem (*Babič a spol., 2008*). Fosfátové skupiny nukleových kyselin udílejí DNA rovněž záporný náboj. Proto byly magnetické nosiče F79/L3 poly-LYSINE v naší studii použity pro magnetickou separaci DNA z mléčných výrobků. Při provedení

magnetické separace kondenzované DNA v prostředí PEG a NaCl byla získána DNA o nižší koncentrace než v případě DNA získané v magnetickou separací v prostředí fosfátového pufru o pH 7,8.

Při porovnání metod magnetické separace DNA aplikované na mléčné výrobky, magnetické separace DNA v prostředí reakčního pufru a magnetické separace kondenzované DNA v prostředí PEG a NaCl lze konstatovat, že pomocí metody magnetické separace DNA v prostředí reakčního pufru byla získána DNA o vyšší koncentraci, a to v kvalitě vhodné pro provedení PCR (Trachtová a spol., 2016). Adsorpce proteinů na částicích je důležitá z hlediska stability DNA během dlouhodobého skladování, protože koextrahované bakteriální intracelulární nukleázy mohou štěpit DNA (Trachtová a spol., 2015). Magnetická separace DNA v prostředí reakčního pufru (fosfátový pufr pH 7,0/pH 7,8) je jednoduchá metoda šetrná k životnímu prostředí a ekonomicky nenáročná.

Pátá část dizertační práce se zabývá bioinformatickou analýzou genomů vybraných bakteriálních druhů využívaných v potravinářství. Studie se zaměřuje na výskyt sekundárních struktur, jako jsou křížové struktury a PQS v nukleových kyselinách. Tyto sekvence se často vyskytují ve specifických pozicích chromozomů (centromera, telomery), nukleosomů a genů (Peixoto a spol., 2013). Genom obsahuje značné množství invertovaných repetit, které jsou distribuovány nepravidelně (Strawbridge a spol., 2010). Invertované repetice se hojně vyskytují jak v prokaryotických, tak i eukaryotických buňkách a formují lokální struktury v DNA důležité pro biologické procesy (van Holde a spol., 1994). Bylo prokázáno, že křížové struktury a kvadruplexy hrají klíčovou roli v základních biologických procesech jako je replikace, transkripce a methylace DNA (Paeschke a spol., 2011; Rampakakis a spol., 2010). Křížové struktury jsou často cílovými místy pro regulační proteiny (Brázda a spol., 2011). V této práci byl analyzován genom jak prokaryotických buněk, tak i eukaryotických buněk. Z prokaryotických buněk byli vybráni zástupci využívaní v mlékárenském průmyslu. Naše analýza potvrdila přítomnost PQS ve všech sledovaných organismech. Nejvíce PQS bylo zjištěno v genomu *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, naopak nejmenší výskyt byl zaznamenán v genomu *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3. Tato analýza byla provedena jako součást výzkumu přítomnosti a lokalizace PQS struktur v doméně Bakterie. Získané výsledky byly publikovány v časopise *Molecules*. Podrobnější informace jsou obsaženy v Příloze 2.

Další bioinformatická studie byla zaměřena na eukaryotický genom *S. cerevisiae*. Genomy a transkriptomy různých organismů, včetně modelového organismu *Escherichia coli* (Rawal a spol., 2006), *S. cerevisiae* (Hershtman a spol., 2008) a člověka, obsahují řadu invertovaných repetit a sekvencí bohatých na G (Huppert, 2005).

Ačkoli pro invertované repetice byly navrženy různé možné funkce, není známo, které z nich se mohou vyskytnout *in vivo* (Strawbridge a spol., 2010). Tuto otázku zkoumáme stanovením distribucí a vlastností IR v genomu *S. cerevisiae*. Kompletní genom *S. cerevisiae* obsahuje 16 chromozomů a mitochondriální DNA. V celém genomu (12 157 105 bp) bylo nalezeno 8951 IR s celkovou frekvencí výskytu 0,74 IR/Kbp. Nejvíce bylo nalezeno IR o velikosti 10 bp. Se vzrůstající velikostí IR klesal počet nalezených IR. Asi třetina IR postrádala smyčku. Poměry mezi IR o různých velikostech smyček (1-10) byly velice vyrovnané. Z hlediska počtu chyb v sekvenci IR převládaly IR s jednou chybou. IR

neobsahujících chybu byla jen zhruba desetina z celkového množství nalezených IR. V mtDNA bylo nalezeno nejvíce IR. Mitochondriální DNA obsahuje značné množství IR (Čechová a spol., 2018).

Dále byl sledován výskyt IR a PQS uvnitř sekvencí a v okolí anotovaných znaků. Sekvence anotovaných znaků byly staženy z databáze NCBI. Byly sledovány následující znaky: gen (9026186), mRNA (8587452), repeat_region (111937), rep_origin (107618), tRNA (19630), ncRNA (33448), centromera (3702), mobilní_element (291801), telomera (140679), STS (7297), rRNA (15327), misc_feature (12429) a misc_RNA (16714). Pro porovnání IR a kvadruplexových frekvencí v různých lokalitách byl použit nejčastěji lokalizovaný „gene“ jako standard pro srovnání s jinými anotovanými znaky. Existují významné rozdíly v distribuci IR v různých segmentech genomu *S. cerevisiae*. V oblastech (± 100 bp) anotovaných znaků byly pozorovány významné změny ve výskytu IR. Nejvyšší obohacení IR bylo zjištěno pro centromeru, dále pak rRNA, rep_origin a STS. Frekvence IR lokalizovaných v centromerách je pětinasobně vyšší než u IR lokalizovaných v genových oblastech. Změny frekvence jsou významnější pro delší IR.

Nejvyšší výskyt PQS byl pozorován v sekvencích telomer, dále pak rRNA a misc_RNA. Velké množství PQS bylo zjištěno kolem tRNA, rep_origin, rRNA a STS. Všechny chromozomy a mtDNA obsahují mnoho IR a PQS. Nadprůměrný výskyt IR se vyskytuje zejména v oblastech promotorů a místech počátku replikace (Brázda a spol. 2016; Krasilnikov a spol., 1999; Pearson a spol., 1996). Významný počet IR a PQS se vyskytuje v důležitých sekvencích pro biologické procesy - centromery, rRNA a v regulačních oblastech - rep_origin. Z tohoto důvodu hrají invertované repetice významnou roli v základních biologických procesech buňky (Čechová a spol., 2018). Již z dřívějších studií je patrné, že získané poznatky jsou v souladu s hypotézou, že kvadruplexové struktury mohou regulovat expresi genů (Hershtman a spol., 2007). Získané výsledky byly odeslány k publikaci do časopisu *Genomics* – viz. Příloha 3.

ZÁVĚR

V předložené dizertační práci s názvem *Izolace a analýza DNA se zaměřením na mikroorganismy důležité v potravinářství* byl optimalizován postup přípravy buněčných lyzátů buněk rodu *Lactobacillus*. Jako lyzační činidlo byl zvolen roztok pracího prostředku. Jako optimální koncentrace lyzačního činidla byl zvolen 4% roztok pracího prostředku s dobou působení lyze 3 hodiny. Při použití tohoto lyzačního postupu nebylo nutné použití přídavku Proteinázy K a SDS. Roztok pracího prostředku Prášek E byl zvolen jako nejvhodnější.

Druhá část se zabývala alternativní metodou izolace nukleových kyselin z bakteriálních buněk. Byly testovány různé koncentrace NaCl, které působily na buněčné lyzáty získané z čistých bakteriálních kultur rodu *Lactobacillus* působením roztoku pracího prostředku. Jako nejvhodnější koncentrace NaCl pro izolaci DNA byly zjištěny koncentrace 1,65 M a 2,2 M.

Třetí část práce byla věnována testování reakčních pufrů a hledání optimálního prostředí pro adsorpci na nosiče a desorpci nukleových kyselin z nosičů. Fosfátový reakční pufr o hodnotě pH 7,8 pro adsorpci nukleových kyselin na polymerní nosiče byl vyhodnocen jako nejúčinnější. Docházelo k vysoké adsorpci DNA na nosiče, a proto byl tento reakční pufr vybrán pro experimenty prováděné s mléčnými výrobky. Pro desorpci nukleových kyselin z nosičů byl zvolen optimální eluční pufr: TE pufr v rozmezí pH 7,8, - 9,0.

Čtvrtá část dizertační práce byla zaměřena na studium různých typů magnetické separace DNA aplikované na reálné vzorky – mléčné výrobky. Při porovnání metod magnetické separace DNA aplikované na mléčné výrobky: magnetická separace DNA v prostředí reakčního pufru a magnetická separace kondenzované DNA v prostředí PEG a NaCl lze konstatovat, že pomocí metody magnetické separace DNA v prostředí reakčního pufru (fosfátový pufr pH 7,8) byla získána DNA o vyšší koncentraci. Také při detekci PCR produktů byly PCR produkty pozitivní u téměř všech vzorků získaných magnetickou separací v prostředí pufru, oproti druhé metodě (izolace kondenzované DNA), kde byly detekovány jen některé PCR produkty.

V poslední části dizertační práce věnované bioinformatické analýze byly analyzovány genomy vybraných bakteriálních druhů využívaných v potravinářství. Byl sledován výskyt PQS při různých citlivostech analýzy. Ve všech genomech byly nalezeny PQS.

Dále byla provedena bioinformatická analýza přítomnosti křížových struktur kompletního genomu *S. cerevisiae*. Celkem bylo analyzováno 12 157 105 bp a bylo nalezeno 8951 IR. Celková frekvence v genomu *S. cerevisiae* byla 0,74 IR/kbp. Se vzrůstající velikostí IR klesal počet nalezených IR. Asi třetina IR zcela postrádala smyčku. IR neobsahujících chybu v sekvenci byla jen zhruba desetina z celkového množství nalezených IR. V mtDNA bylo nalezeno nejvíce IR. Množství IR u mtDNA bylo mnohonásobně vyšší oproti obsahu IR v chromozomech.

Dále byl sledován výskyt IR a kvadrupelexů uvnitř sekvencí a v okolí anotovaných znaků. Nejvyšší obohacení IR bylo zjištěno pro centromeru, dále pak rRNA, rep_origin a STS. Frekvence IR lokalizovaná v centromerách je 5krát vyšší než u IR lokalizovaných v genu.

Nejvyšší výskyt PQS byl pozorován v sekvencích telomer, dále pak rRNA a misc_RNA. Velké množství PQS bylo zjištěno kolem tRNA, rep_origin, rRNA a STS.

SEZNAM ZKRATEK

C	cytosin
DEAE	diethylaminoethanol
DLS	dynamický rozptyl světla
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
G	guanin
G-kvadruplex	Guaninový kvadruplex
Chr	chromozom
IDA	iminodioctová kyselina
IMS	imunologické magnetické separace
IR	invertovaná repetice
misc_feature	miscellaneous feature
misc_RNA	miscellaneous RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
mRNA	mediátorová RNA
mobile_element	mobilní jednotka
MSPE	magnetic solid - phase extraction
NCBI	National center for biotechnology information
ncRNA	nekódující RNA
PAMAM	poly(amidoamin)
PCR	polymerázova řetězová reakce
PEG	poly(ethylenglykol)
PGMA	poly(glycidyl methakrylát)
P(HEMA)	poly(2-hydroxyethylmethakrylát)
P(HEMA-co-EDMA)	poly(2-hydroxyethylmethakrylát-co-ethylenemethakrylát)
P(HEMA-co-GMA)	poly(2-hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát)
PMMA	poly(methylmetakrylát)
PS	polystyren
rep_origin	počátek replikace
PQS	potenciální sekvence kvadruplexů
repeat_region	repetitivní sekvence
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
STS	sequence-tagged site
Supernat.	supernatant
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
tRNA	transferová RNA

TEOS

UV

VIS

tetraethoxysilan

ultrafialová oblasť

viditeľná oblasť

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGUILAR–ARTEAGA K., RODRIGUEZ J. A., E. BARRADO: Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2010a, roč. 674, s. 157-165. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043

AGUILAR–ARTEAGA K., RODRIGUEZ J. A., MIRANDA J. M., MEDINA J., E. BARRADO: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion-HPLC. *Talanta*. 2010b, roč. 80, č. 3, s. 1152-1157. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.08.042

ALEXANDER L. M., OH J.-H., STAPLETON D. S., SCHUELER K. L., KELLER M. P., ATTIE A. D., VAN PIJKEREN J.-P., STABB E. V.: Exploiting Prophage-Mediated Lysis for Biotherapeutic Release by *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019, 85(10), e02335-18. DOI: 10.1128/AEM.02335-18

AUTY M. A. E., GARDINER G. E., MCBREARTY S. J., et al.: Direct In Situ Viability Assessment of Bacteria in Probiotic Dairy Products Using Viability Staining in Conjunction with Confocal Scanning Laser Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67(1), 420-425. DOI: 10.1128/AEM.67.1.420-425.2001

BABIČ, M., HORÁK D., TRCHOVÁ M., et al.: Poly(l -lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Bioconjugate Chemistry*. 2008, 19(3), 740-750. DOI: 10.1021/bc700410z. ISSN 1043-1802

BANERJEE T., MITRA S., SINGH A. K., SHARMA R. K., MAITRA A.: Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, č. 243. DOI: S0378-5173(02)00267-3

BARTAS M., BRÁZDA V., KARLICKÝ V., ČERVENĚ J., PEČINKA P.: Bioinformatics analyses and in vitro evidence for five and six stacked G-quadruplex forming sequences. *Biochimie*. 2018, 150, 70-75. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.05.002

BARTAS M., ČUTOVÁ M., BRÁZDA V., KURA P., ŠŤASTNÝ J., KOLOMAZNÍK J., COUFAL J., GOSWAMI J., ČERVENĚ J., PEČINKA P., The Presence and Localization of G-Quadruplex Forming Sequences in the Domain of Bacteria. *Molecules*. 2019, 24(9). DOI: 10.3390/molecules24091711

BEDRAT A., Laurent L., Jean-Louis M.: Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Research*. 2016, 44(4), 1746-1759. DOI: 10.1093/nar/gkw006

BEN AMOR K., VAUGHAN E. E., DE VOS W. M.: Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Nutrition*. 2007, 137(3), 741-747. DOI: 10.1093/jn/137.3.741 S

BERENSMEIER S.: Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, roč. 73, č. 3, s. 495-504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0

BIKARD D., LOOT C., BAHAROGLU Z., MAZEL D.: Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010, 74(4), 570-588. DOI: 10.1128/MMBR.00026-10

BLOOMFIELD V. A., CROTHERS D. M., TINOCO I. J.: Nucleic Acids. Structure, Properties and Functions. University Science Books, Sausalito, CA 2000

BORRERO-DE ACUÑA J. M., HIDALGO-DUMONT C., PACHECO N., CABRERA A., POBLETE-CASTRO I.: A novel programmable lysozyme-based lysis systém in *Pseudomonas putida* for biopolymer production. *Scientific Reports*. 2017, 7(1). DOI: 10.1038/s41598-017-04741-2

BRÁZDA V., KOLOMAZNÍK J., LÝSEK J., HÁRONÍKOVÁ L., COUFAL J., ŠT'ASTNÝ J.: Palindrome analyser – A new web-based server for predicting and evaluating inverted repeats in nucleotide sequences. *Biochemical and Biophysical Research*. 2016, 478(4), 1739-1745. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.015

BRÁZDA V., LAISTER R. C., JAGELSKÁ E. B., ARROWSMITH Ch.: Cruciform structures are a common DNA feature important for regulating biological processes. *BMC Molecular Biology*. 2011, 12(1). DOI: 10.1186/1471-2199-12-33

CAO L.Q., R. D. SCHMID: Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design. Wiley, 2005, 578 s. ISBN: 978-3-527-31232-0

ČECHOVÁ J., LÝSEK J., BARTAS M., BRÁZDA V., HANCOCK J.: Complex analyses of inverted repeats in mitochondrial genomes revealed their importance and variability. *Bioinformatics*. 2018, 34(7), 1081-1085. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx729

DAI X., GREIZERSTEIN M. B., NADAS-CHINNI K., ROTHMAN-DENES L. B.: Supercoil-induced extrusion of a regulatory DNA hairpin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, 94(6), 2174-2179. DOI: 10.1073/pnas.94.6.2174

Danone [online, cit. říjen 2014] <http://www.actimel.cz/>

DE BRUIN O. M., CHIEFARI A., WROBLEWSK D., EGAN Ch., KELLY-CIRINO C. D.: A novel chemical lysis method for maximum release of DNA from difficult-to-lyse bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 2019, 126, 292-297. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.008

DE LA ESCOSURA-MUÑIZ A., PLICHTA Z., HORÁK D., MERKOČI A.: Alzheimer's disease biomarkers detection in human samples by efficient capturing through porous magnetic microspheres and labelling with electrocatalytic gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 67, 162-169. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.086

DEL CAMPO, A., T. SEN, J.-P. LELLOUCH a I. J. BRUCEA. Multifunctional magnetite and silica–magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, č. 293, 33–40. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.01.040

DUBERNET S., DESMASURES N., GUÉGUEN M.: A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, 214(2), 271-275. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11358.x

DYNAL – Technical Handbook, *Biomagnetic Techniques in Molecular Biology (2nd ed.)*, Dynal A.S, Oslo, Norway 1995

EHRMANN M. A., VOGEL R. F.: Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*. 2005, 16(1-3), 31-42. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.06.004

ESPINOSA J. M.: Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. *Oncogene*. 2008, 27(29), 4013-4023. DOI: 10.1038/onc.2008.37

ESUMI, K., Y. NAKAIE, K. SAKAI a K. TORIGOE. Adsorption of poly(ethyleneglycol) and poly(amidoamine)dendrimer from their mixtures on alumina/water and silica/water interfaces. *Colloids and Surfaces*. 2001, č. 194, s. 7-12. DOI: 10.1016/S0927-7757(00)00788-3

GONG R., LI S.: Extraction of human genomic DNA from whole blood using a magnetic microsphere method. *International Journal of Nanomedicine*. DOI: 10.2147/IJN.S59545

GUARNER F, SCHAAFSMA G. J.: Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 39:237–238.

GUPTA K., GUPTA M.: Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005, roč. 26 s. 3995-4021. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012

HADDAD Y., DOSTALOVA S., KUDR J., ZITKA O., HEGER Z., ADAM V.: DNA-magnetic Particle Binding Analysis by Dynamic and Electrophoretic Light Scattering. *Journal of Visualized Experiments*. 2017, (129). DOI: 10.3791/56815. ISSN 1940-087X

HAGAN, K. A., MEIER W. L., FERRANCE J. P., LANDERS J. P.: Chitosan-Coated Silica as a Solid Phase for RNA Purification in a Microfluidic Device. *Analytical Chemistry*. 2009, roč. 81, č. 13, s. 5249-5256. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac900820z

HAIHUI J., HAN X., LI Z., CHEN X., HOU Y., GAI L., LI D., LU X., F. TILING: Superparamagnetic core-shell structured microspheres carrying carboxyl groups as adsorbents for purification of genomic DNA. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012, roč. 401, č. 5, s. 74-80. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.03.024

HAO D., S., CHENG-MIN H., CHAO X., ZHI-CHUAN L., CHEN T., YUAN S., XUE-ZHAO, HONG-JUN G.: Synthesis and properties of Au-Fe₃O₄ and Ag-Fe₃O₄ heterodimeric nanoparticles. *Chinese Physics B*. 2010-06-01, roč. 19, č. 6, s. 066102-. ISSN 1674-1056. DOI: 10.1088/1674-1056/19/6/066102

HERSHMAN S. G., CHEN Q., LEEJ. Y., KOZAK M. L., YUE P., WANG L.-S., JOHNSON F. B.: Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 2008, 36(1), 144-156. DOI: 10.1093/nar/gkm986

VAN HOLDE K., ZLATANOVA J.: Unusual DNA structures, chromatin and transcription. *BioEssays*. 1994, 16(1), 59-68. DOI: 10.1002/bies.950160110

HORÁK D., BABIČ M., MACKOVÁ H., M. J. BENEŠ: Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*. 2007, roč.30, č. 11, s. 1751-1772. DOI: 10.1002/jssc.200700088

HORÁK D., BENEDYK N.: Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004, roč. 42, č. 22, s. 5827-5837. DOI: 10.1002/pola.20406

HORÁK D.: Magnetic polyglycidylmethacrylate microspheres by dispersion polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2001, roč. 39, č. 21, s. 3707-3715. DOI: 10.1002/pola.10000

HORÁK D., RITTICH B., ŠPANOVÁ A., M. J. BENEŠ: Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics. *Polymer*. 2005, roč. 46, č. 4, s. 1245-1255. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.11.049

HORÁK D., SEMENYUK N., F. LEDNICKÝ: Effect of the reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in the presence of ferrofluid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2003, roč. 41, č. 12, s. 1848-1863. DOI: 10.1002/pola.10728

HRIBERNIK S., SFILIGOJ-SMOLE M., BELE M., GYERGZEK S., JAMNIK J., K. STANA-KLEINSCHEK: Synthesis of magnetic iron oxide particles: Development of an in situ coating procedure for fibrous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012, roč. 400, s. 58-66. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.02.052

HU Q., LIU Y., YI S., HUANG D.: A comparison of four methods for PCR inhibitor removal. *Forensic Science International: Genetics*. 2015, 16, 94-97 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.12.001

HUPPERT J. L.: Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Research*. 2005, 33(9), 2908-2916. DOI: 10.1093/nar/gki609

CHEN J., WANG Y., DING X., HUANG Y., XU K.: Magnetic solid-phase extraction of proteins based on hydroxy functional ionic liquid-modified magnetic nanoparticles. *Analytical Methods*. 2014, 6(20), 8358-8367. DOI: 10.1039/C4AY01786B

JAGELSKÁ E. B., PIVOŇKOVÁ H., FOJTA M., BRÁZDA V.: The potential of the cruciform structure formation as an important factor influencing p53 sequence-specific binding to natural DNA targets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, 391(3), 1409-1414. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.076

JI Y., YIN J., XU Z., ZHAO C., HUANG H., ZHANG H., C. WANG: Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for rapid determination of bisphenol A in environmental water and milk samples. *Analytical and Bioanalytical chemistry*. 2009, roč. 395, č.4, s. 1125-1133. DOI: 10.1007/s00216-009-3020-5

JIANG CH., XU S., ZHANG S., L. JIA: Chitosan functionalized magnetic particle-assisted detection of genetically modified soybeans based on polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 2012, roč. 420, č. 1, s. 20-25. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/j.ab.2011.09.004

JOST Ch. A., MARIN M. C., Kaelin JR. W.G.: P73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. 1997, 389(6647), 191-194. DOI: 10.1038/38298

KAMAN O., VEVERKA PJIRÁK Z., et al.: The magnetic and hyperthermia studies of bare and silica-coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011, 13(3), 1237-1252. DOI: 10.1007/s11051-010-0117-x

KALOUSOVÁ M., LEVOVÁ K., KUBĚNA A. A., JÁCHYMOVÁ M., FRANKOVÁ V., ZIMA T.: Comparison of DNA isolation using salting-out procedure and automated isolation (MagNA system). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2017, 47(7), 703-708. DOI: 10.1080/10826068.2017.1303613

KEAWCHAOON, L. a R.YOKSAN. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, č. 84, 163–171. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.12.031

KELES G., DEMIRCI U.: The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale–Hungarian vetch silage and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology*. 2011, 164(1-2), 21-28. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2010.11.017

KENAWY E. R., ABDEL-HAY F. I., ELSHANSHOURY A. R., M. EL-NEWEHY: Biologically active polymers: synthesis and antimicrobial activity of modified glycidyl methacrylate polymers having a quaternary ammonium and phosphonium groups. *Journal Controlled Release*. 1998, roč. 50, č. 1-3, s. 145-152. DOI: 10.1016/S0168-3659(97)00126-0

KHALAFALLA S., G. REIMERS: Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *IEEE Transactions on Magnetics*. 1980, roč. 16, č. 2, s. 178-183. DOI: 10.1109/TMAG.1980.1060578

KIKIN O., D'ANTONIO L., BAGGA P. S.: QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*. 2006, 34, 676-682. DOI: 10.1093/nar/gkl253

KLEIDEITER, G. a E. NORDMEIER. Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions I. Theoretical considerations. *Polymer*. 1999a, č. 40, s. 4013-4023. DOI: 10.1016/S0032-3861(98)00643-0

KLEIDEITER, G., NORDMEIER, E., Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions II. Comparison between experiment and theory. *Polymer* 1999b, 40, 4025-4033. DOI: 10.1016/S0032-3861(98)00644-2

KNOPP D., TANG D., NIESSNER R.: Review: Bioanalytical applications of biomolecule – functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Analytica Chimica Acta*. 2009, roč. 647, s. 14-30. DOI: 10.1016/j.aca.2009.05.037

KOCH A.L.: Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*. 1998, 149(10), 689-701. DOI: 10.1016/S0923-2508(99)80016-3

KRÁLOVÁ, B., FUKAL, L., RAUCH, P., RUMIL T.: Bioanalytické metody. Vysoká škola chemicko – technologická, Praha, 3. vydání, 2001. 254 s. ISBN 01-303-21/01

KIRKPATRICK F. H.: *Overview of agarose gel properties. Electrophoresis of large DNA molecules: Theory and applications*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 1990, Paper 9-22

KŘÍŽOVÁ J., ŠPANOVÁ A., RITTICH B., D. HORÁK: Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*. 2005, roč. 1064, č. 2, s. 247-253. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.014

LAURENT S., FORGE D., PORT M., ROCH A., ROBIC C., VANDER L., R. N. MÜLLER: Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*. 2008, roč. 108, č. 6, s. 2064-2110. DOI: 10.1021/cr068445e

LEE J., CHANG J. H.: Magnetic DNA Separation Process with Functionalized Magnetic Silica Nanoparticles. *Biomedical Applications of Micro- and Nanoengineering IV and Complex Systems*. 2008, roč. 7270, s. 153-801 DOI: 10.1117/12.814120

LEE P. Y., COSTUMBRADO J., HSU Ch.-Y., KIM Y. H.: Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (62). DOI: 10.3791/3923

LEHNINGER A. L., NELSON D. L., COX M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman, c2013. ISBN 978-1429234146

LENFENLD J.: Magnetic bead cellulose. *Macromolecular Materials and Engineering: Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. 1993, roč. 272, č. 1, s. 147-155. DOI: 10.1002/apmc.1993.052120113

LEVASHOV P. A., MATOLYGINA D. A., OVCHINNIKOVA E. D., ADAMOVA I. Y., DMITRIEVA O. A., NUZHDINA A. V., POKROVSKY N. S., EREMEEV N. L.: New Sorbent on the Basis of Covalently Immobilized Lysozyme for Removal of Bacterial

Lipopolysaccharide (Endotoxin) from Biological Fluids. *Biochemistry (Moscow)*. 2019, 84(1), 33-39. DOI: 10.1134/S0006297919010048

LEVISON P. R., BADGER S. EHATHI P., DAVIES M. J., BRUCE I. J., V. GRIMM V.: New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998, č. 827, 337–344. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00681-5

LI L. Z., LIU Y., SUN M. S., SHAO Y. M.: Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007, roč. 1139, č. 2, s. 228-235. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.11.027

LIU, G., R. Y. HONG, L. GUO, G. H. LIU, B. FENG a Y. G. LI. Exothermic effect of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic fluid and its compatibility with blood. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, č. 380. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.03.006

LORENZ T. C.: Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (63). DOI: 10.3791/3998

LU A-H., SALABAS E. L., F. SCHÜT: Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandete chemie*. 2007, roč. 46, s. 1222–1244. DOI: 10.1002/anie.200602866

MA Z., LIU H.: Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology*. 2007, roč. 5, č. 1-2, s. 1-10. DOI: 10.1016/j.cpart.2006.11.001

MACKOVÁ H., KRÁLOVÁ H., D. HORÁK: Magnetic poly(N-isopropylacrylamide) microspheres by dispersion and inverse emulsion polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2007, roč. 45, č. 24, s. 5884-5898. DOI: 10.1002/pola.22341

MAEDA Y., YOSHINO T., TAKAHASHI M., GINYA H., ASAHINA J., MATSUNAGA H., T. MATSUNAGA. Noncovalent Immobilization of Streptavidin on *In Vitro*- and *In Vivo*-Biotinylated Bacterial Magnetic Particles. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, roč. 74, č. 16, s. 5139-5145. DOI: 10.1128/AEM.00618-08

MAITRA A.N., GHOSH P.K., DE T.K., SAHOO S.K., 1999. *Process for the preparation of highly monodispersed hydrophilic polymeric nanoparticles of size less than 100 nm*. US Patent 5,874,111

MANCHANDA R., NIMESH S.: Controlled size chitosan nanoparticles as an efficient, biocompatible oligonucleotides delivery system. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, n/a-n/a. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.32508

MAO H. Q., ROY K., TROUNG-LE V. L., JANES K. A., LIN K. Y., WANG, Y.; AUGUST J. T., LEONG K. W.: Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*. 2001, Volume 70, Issue 3, Pages 399-421. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00361-8

MARTÍN-PLATERO A.M., VALDIVIA E., MAQUEDA M., MARTÍNEZ-BUENO M.: Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure. *Analytical Biochemistry*. 2007, 366(1), 102-104. DOI: 10.1016/j.ab.2007.03.010. ISSN 00032697

MATSUNAGA T., OKAMURA Y., T. TANAKA. Biotechnological application of nano-scale engineered bacterial magnetic particles. *Journal of Materials Chemistry*. 2004, roč. 14, s. 2099-2105. DOI: 10.1039/B404844J

MAZUR S. J., SAKAGUCHI K., APPELLA E., WANG X. W., HARRIS C. C., BOHR V. A.: Preferential binding of tumor suppressor p53 to positively or negatively supercoiled DNA involves the C-terminal domain 1 Edited by K. Yamamoto. *Journal of Molecular Biology*. 1999, 292(2), 241-249. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3064

MCBAIN S. C., HUMPREY H. P., DOBSON Y. J.: Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2008, roč. 3, č. 2, s. 169-180. DOI: 10.2147/IJN.S1608

MELZAK K. A., SHERWOOD C. S., TURNER R. F. B., C. HAYNES: Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal Colloid Interface Science*. 1996, roč. 181, č. 2, s. 635-644. DOI: 10.1006/jcis.1996.0421

MILLER S.A., DYKES D.D., POLESKY H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988, 16(3), 1215-1215. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215

MISHRA S. K., SHANKAR U., JAIN N., SIKRI K., TYAGI J. S., SHARMA, Jean-Louis MERGNY T. K., KUMAR A.: Characterization of G-Quadruplex Motifs in espB, espK, and cyp51 Genes of Mycobacterium tuberculosis as Potential Drug Targets. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2019, 16, 698-706. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.04.022. ISSN 21622531

MIURA O., OGAKI T., YONEYAMA H., KIKUCHI Y., OHYAMA T.: A strong structural correlation between short inverted repeat sequences and the polyadenylation signal

in yeast and nucleosome exclusion by these inverted repeats. *Current Genetics*. 2019, 65(2), 575-590. DOI: 10.1007/s00294-018-0907-8

Mlékárna Kunín [online, cit. říjen 2014] <http://www.mlekarna-kunin.cz/>

Mlékárna Valmez [online, cit. říjen 2014] <http://www.mlekarna-valmez.cz/>

MODY V. V., COX A., SHAH S., SINGH A., BEVINS W., PARIHAR H.: Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Applied Nanoscience*. 2014, 4(4), 385-392. DOI: 10.1007/s13204-013-0216-y

MOUAZIZ H., VEYRET R., THERETZ A., GINOT F., ELAISSARI A.: Aminodextran Containing Magnetite Nanoparticles for Molecular Biology Applications: Preparation and Evaluation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2009, č. 2, s. 172-181. DOI: 10.1166/jbn.2009.1023

NAKAGAWA T., HASHIMOTO R., MARUYAMA K., TANAKA T., TAKEYAMA H., MATSUNAGA T.: Capture and release of DNA using aminosilane-modified bacterial magnetic particles for automated detection system of single nucleotide polymorphisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, č. 94, 862–868. DOI: 10.1002/bit.20904

NASH J. A., BALLARD T. N. S., WEAVER T. E., AKINBI H. T.: The Peptidoglycan-Degrading Property of Lysozyme Is Not Required for Bactericidal Activity In Vivo. *The Journal of Immunology*. 2006, 177(1), 519-526. DOI: 10.4049/jimmunol.177.1.519. ISSN 0022-1767

Olma [online, cit. říjen 2014] <http://www.olma.cz/>

PACHECO COELLO R., PESTANA JUSTO J., FACTOS MENDOZA A., SANTOS ORDOÑEZ E.: Comparison of three DNA extraction methods for the detection and quantification of GMO in Ecuadorian manufactured food. *BMC Research Notes*. 2017, 10(1). DOI: 10.1186/s13104-017-3083-x

PEANO C., SAMSON M. C., PALMIERI L., GULLI M., MARMIROLI N.: Qualitative and Quantitative Evaluation of the Genomic DNA Extracted from GMO and Non-GMO Foodstuffs with Four Different Extraction Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(23), 6962-6968. DOI: 10.1021/jf040008i

PEČOVÁ M., ZAJONCOVÁ L., POLÁKOVÁ K., ČUDA J., ŠAFAŘÍKOVÁ M., ŠEBELA M., I. ŠAFAŘÍK: Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy*. 2011, roč. 105, č. 7, s. 524-530

PERSSON J., JOHANSSON H.-O., GALAEV I., MATTIASSON B., TJERNELD F.: Aqueous polymer two-phase systems formed by new thermoseparating polymers. *Bioseparation*. 2000,9(2), 105-116. DOI: 10.1023/A:1008167603733

PHAM T. T.-H., SIM S. J.: Electrochemical analysis of gold-coated magnetic nanoparticles for detecting immunological interaction. *Journal of Nanoparticle Research*. 2010, č. 12, s. 227-235. DOI: 10.1007/s11051-009-9600-7

POLLARD T., CEARNSHAW D. W., LIPPINCOTT-SCHWARTZ J.: Cell biology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008, 905 s. ISBN 978-141-6022-558

PRNKA T., ŠPERLINK K.: Bionanotechnologie, nanobiotechnologie, nanomedicína., Repronis Ostrava, 2006, 177 s., ISBN: 80-7329-134-7

RSC Publishing [online, cit. listopad 2012] <http://pubs.rsc.org>

RAHMAN M., M. A. ELAISSARI: Temperature and magnetic dual responsive microparticles for DNA separation. *Separation and Purification Technology*. 2011, roč. 81, č. 3, s. 286-294. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.07.030

RAMANATHAN T., FISHER T., RUOFF R. S., L. C. BRINSONET: Amino-Functionalized Carbon Nanotubes for Binding to Polymers and Biological Systems. *Chemistry of Materials*. 2005, roč. 17, č. 6, s. 1290-1295 DOI: 10.1021/cm048357f

RAWAL P.: Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: Role in Escherichia coli global regulation. *Genome Research*. 2006, 16(5), 644-655. DOI: 10.1101/gr.4508806

RITTICH B., ŠPANOVA A., D. HORÁK: Carboxyl – functionalized magnetic carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2007, roč. 311, č. 1, s. 249-254. DOI: 10.1016/j.jmmm. 2006.10.1157

RHODES D., LIPPS H.J.: G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Research*. 2015, 43(18), 8627-8637. DOI: 10.1093/nar/gkv862

ROSYPAL S.: Úvod do molekulární biologie – díl první. Brno, Nakladatelství Rosypal, 2006. 288 s. ISBN 80-902562-5-2

ROTARIU O., OGDEN I. D., MACRAE M., BADESCU V., N. J.C. STRACHAN. An immunomagnetic separator for concentration of pathogenic micro-organisms from large volume samples. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, roč. 293, č. 1, s. 589-596. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.01.078

SALAZAR O., ASENJO J. A.: Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology Letters*. 2007, 29(7), 985-994. DOI: 10.1007/s10529-007-9345-2

SAMBROOK J., RUSSELL D. W.: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 3 sv. ISBN 978-0-87969577-4

SHAN Z., LI X., GAO Y., WANG X., LI Ch., Q. WU: Application of magnetic hydroxyapatite nanoparticles for solid phase extraction of plasmid DNA. *Analytical Biochemistry*. 2012, roč. 425, č. 2, s. 125-127. DOI: 10.1016/j.ab. 012.03. 013

SHLYAKHTENKO L. S., HSIEH P., GRIGORIEV M., POTAMAN V. N., SINDEN R. R., LYUBCHENKOY. L.: A cruciform structural transition provides a molecular switch for chromosome structure and dynamics 1 Edited by I. Tinoco. *Journal of Molecular Biology*. 2000, 296(5), 1169-1173. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3542

SCHRADER C., SCHIELKE A., ELLERBROEK L., JOHNE R.: PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, 113(5), 1014-1026 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

STRAWBRIDGE E. M., BENSON G., GELFAND Y., BENHAM C. J.: The distribution of inverted repeat sequences in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Current Genetics*. 2010, 56(4), 321-340 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1007/s00294-010-0302-6

SUGIMOTO T.: Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1980, roč. 74, č. 1, s. 227-243. DOI: 10.1016/0021-9797(80)90187-3

ŠAFAŘÍK I., M. ŠAFAŘÍKOVÁ: Batch isolation of hen egg white lysozyme with magnetic chitin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1993, roč. 27, č. 4, s. 327-330. DOI: 10.1016/0165-022X(93)90013-E

ŠAFAŘÍK I., ŠAFAŘÍKOVÁ M.: Use of magnetic techniques for the isolation of cell. *Journal of Chromatography B*. 1999, roč. 722, s. 33-35. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00338-7

ŠAFAŘÍK I., ŠAFAŘÍKOVÁ M.: Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*. 2004, roč.2, č.17. DOI: 10.1186/1477-044X-2-7

ŠAFAŘÍK I., ŠAFAŘÍKOVÁ M., FORSYTHE S. J.: The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995, roč. 78, č. 6, s. 578-585. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03102.x

ŠAFAŘÍKOVÁ M., ROY I., GUPTA M. N., ŠAFAŘÍK I.: Magnetic alginate microparticles for purification of α -amylases. *Journal of Biotechnology*. 2003, č. 105. DOI: 0.1016/j.jbiotec.2003.07.002

ŠÁLEK P.: Příprava a charakterizace vysoce zesíťovaných polymerních nosičů. Praha, 2010, Teze disertační práce

ŠPANOVÁ A., HORÁK D., SOUDKOVÁ E., RITTICH B.: Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications. *Journal of Chromatography B*. 2004, č. 800, 27–32. DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.09.010

ŠVEC P., KUKLETOVÁ M., SEDLÁČEK I.: Comparative evaluation of automated ribotyping and RAPD-PCR for typing of *Lactobacillus* spp. occurring in dental caries. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010, 98(1), 85-92. DOI: 10.1007/s10482-010-9432-6

TAMER U., BOYACI I. H., TEMUR E., ZENGİN A., DINCER I., ELERMAN Y.: Fabrication of magnetic gold nanorod particles for immunomagnetic separation and SERS application. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011, s. 3167-3176

TATEISHI-KARIMATA H., SUGIMOTO N.: Biological and nanotechnological applications using interactions between ionic liquids and nucleic acids. *Biophysical Reviews*. 2018, 10(3), 931-940. DOI: 10.1007/s12551-018-0422-7

TAYLOR J., HURST C. D., DAVIES M., SACHSINGER N., I. B. BRUCE: Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA. *Journal of Chromatography A*. 2000, roč. 890, č. 1, s. 159-166. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00107-2

TRACHTOVÁ Š., KAMAN O., ŠPANOVÁ A., VEVERKA P., POLLERT E., RITTICH B.: Silica coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation. *Journal of Separation Science*. 2011, č. 34, 3077-3082. DOI: 10.1002/jssc.201100442

TRACHTOVÁ Š., ŠPANOVÁ A., HORÁK D., KOZÁKOVÁ H., RITTICH B.: Real-Time Polymerase Chain Reaction as a Tool for Evaluation of Magnetic Poly(Glycidyl methacrylate)-Based Microspheres in Molecular Diagnostics. *Current Pharmaceutical Design*. 2016, 22(5), 639-646. DOI: 10.2174/1381612822666151228105006

TRACHTOVÁ Š., ZAPLETALOVÁ H., ŠPANOVÁ A., HORÁK D., KOLÁŘOVÁ H., RITTICH B.: The Evaluation of Magnetic Polymethacrylate-based Microspheres Used for Solid Phase DNA Micro-Extraction. *Chromatography*. 2015, 2(2), 156-166. DOI: 10.3390/chromatography2020156.

TU X., SUN F., WU S., LIU W., GAO Z., HUANG S., CHEN W.: Comparison of salting-out and sugaring-out liquid–liquid extraction methods for the partition of 10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly and their co-extracted protein content. *Journal of Chromatography B*. 2018, 1073, 90-95. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.12.020

TURKOVÁ K., RITTICH B., ŠPANOVÁ A.: Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods. *Chemical Papers*. 2012, 66(9). DOI: 10.2478/s11696-012-0206-7

VANDEVENTER P. E., WEIGEL K. M., SALAZAR J., et al.: Mechanical Disruption of Lysis-Resistant Bacterial Cells by Use of a Miniature, Low-Power, Disposable Device. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, 49(7), 2533-2539. DOI: 10.1128/JCM.02171-10

VASILEVSKAYA V. V., KHOKHLOV A.R., MATSUZAWA Y., YOSHIKAWA K. Collapse of Single DNA in poly(ethylene glycol) solutions. *The Journal of Chemical Physics*. 1995;102:6595–6602. DOI: 10.1063/1.469375

VEYRET R., DELAIR T., PICHOT CH., ELAISSARI A.: Amino-containing magnetic nanoemulsions: elaboration and nucleic acid extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, č. 295, 55–163. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.01.008

WATSON J. D., CRICK F. H. C.: Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953, roč. 171, č. 4356, s. 737-738. DOI: 10.1038/171737a0

WANG Y., LEUNG F. C. C.: A study on genomic distribution and sequence features of human long inverted repeats reveals species-specific intronic inverted repeats. *FEBS Journal*. 2009, 276(7), 1986-1998. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06930.x

WANG Y., LEUNG F. C. C.: Long inverted repeats in eukaryotic genomes: Recombinogenic motifs determine genomic plasticity. *FEBS Letters*. 2006, 580(5), 1277-1284. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.01.045

WARBURTON P. E.: Inverted Repeat Structure of the Human Genome: The X-Chromosome Contains a Preponderance of Large, Highly Homologous Inverted Repeats That Contain Testes Genes. *Genome Research*. 2004, 14(10a), 1861-1869. DOI: 10.1101/gr.2542904. ISSN 1088-9051

WIELINGA P. R., DE HEER L., Astrid DE GROOT A., HAMIDJAJA R. A., BRUGGEMAN G., JORDAN K., VAN ROTTERDAM B. J.: Evaluation of DNA extraction

methods for *Bacillus anthracis* spores spiked to food and feed matrices at biosafety level 3 conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 150(2-3), 122-127. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.023

YANG, CH., GUAN Y., XING J., H. LIU: Surface Functionalization and Characterization of Magnetic Polystyrene Microbeads. *Langmuir*. 2008, roč. 24, č. 16, s. 9006-9010. DOI: 10.1021/la7040

YANG Y., ZHU W., FENG L, et al.: G-Quadruplex-Based Nanoscale Coordination Polymers to Modulate Tumor Hypoxia and Achieve Nuclear-Targeted Drug Delivery for Enhanced Photodynamic Therapy. *Nano Letters*. 2018, 18(11), 6867-6875. DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b02732

YOZA B., MATSUMOTO M., T. MATSUNAGA: DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *Journal Biotechnology*. 2002, roč. 94, č. 3, s. 217-224. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00427-8

ZHANG J., ZHI X., ZHANG M., et al. Efficacy and feasibility of the immunomagnetic separation based diagnosis for detecting sentinel lymph node metastasis from breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2015. DOI: 10.2147/IJN.S72263

ZHAO G., WANG J., LI Y., CHEN X., Y. LIU: Enzymes Immobilized on Superparamagnetic Fe₃O₄@Clays Nanocomposites: Preparation, Characterization, and a New Strategy for the Regeneration of Supports. *Journal of Physical Chemistry*. 2011, roč. 115, č. 14, s. 6350-6359. DOI: 10.1021/jp200156j

ZUKER, M.: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*. 2003, 31(13), 3406-3415. DOI: 10.1093/nar/gkg595

STRUČNÝ ŽIVOTOPIS AUTORKY

Osobní údaje:

Jméno a příjmení:	Ing. MICHAELA ČUTOVÁ
Rodné příjmení:	Fričová
Místo narození:	Opava, Česká republika
Státní příslušnost:	česká

Dosažené vzdělání:

2010 – dosud: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická: Chemie a technologie potravin: Potravinářská chemie – PhD. (18. 6. 2013 vykonání Státní doktorské zkoušky)

2008–2010: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická: Chemie a technologie potravin: Potravinářská chemie a biotechnologie – Ing. (diplomová práce: Transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů)

2005–2008: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická: Chemie a technologie potravin: Biotechnologie – Bc. (bakalářská práce: Stanovení chloridů ve farmaceutických substancích)

2001–2005: Mendelovo gymnázium Opava

Odborná praxe:

2006–2007: IVAX Pharmaceuticals s.r.o. (TEVA) Opava, oddělení Výzkumu a vývoje, Ostravská 29, 74770 Opava – laborant - příprava vzorků pro analýzu, Titrační metody, HPLC

2009–2010: *BioVendor – Laboratorní medicína a.s.* divize Laboratorní medicína, CTPark, Modřice, oddělení Výzkumu a vývoje – Proteinová chemie, Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, laborant – kultivace buněk, izolace plazmidů, transientní transfekce

2014–2016: McBride Czech a.s., oddělení Kontroly a řízení jakosti, Dusíkova 795/7 638 00 Brno, laborant fyzikální chemie, kontrola kvality vstupních surovin, vyrobených meziproductů a finálních výrobků.

Jazykové znalosti:

Angličtina –pokročilý

Němčina –pokročilý

Španělština – pasivně

Dovednosti:

Řidičský průkaz sk. B – aktivní řidič

Počítačové znalosti: Microsoft office, MATLAB, ChemSketch, Helios green, Comes

PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI, KONFERENČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ A PROJEKTŮ

Konferenční příspěvky:

Čuta R., Fričová M., Rittich B., Španová A. *Testing different types lysis method for the preparation of the bacterial cell lysates with subsequent isolation and amplification of DNA*. 2014. s. 170-171.

Fričová, M., Rittich, B., Španová, A. *The use of iont potencial at the bacterial DNA separatio by amino functionalized magnetic nanopartocles*. 2014.

Fričová, M.; Čuta, R.; Trachtová, Š.; Španová, A.; Rittich, B. *Identifikace mikroorganismů v přípravku pro biodegradaci lipidů molekulárně biotechnologickými metodami*. 2012. s.26.

Čuta, R., Fričová, M., Španová, A., Rittich, B. *Zjednodušený postup izolace DNA z buněk bakterií rodu Lactobacillus*. Brno: 2012. s. 20.

Čuta, R.; Fričová, M.; Španová, A.; Rittich, B. *Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk rodu Lactobacillus připravených působením enzymů a detergentů obsažených v pracích práscích*. Brno: Masarykova univerzita, 2011. s. 65.

Čuta, R.; Fričová, M.; Španová, A.; Rittich, B.. *The use of enzymes contained in the washing powders to the preparation of the crude lyzates of Lactobacillus cells for magnetic DNA isolation*. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. s1009 (s1009 s.) ISSN: 0009-2770.

Fričová, M.; Čuta, R.; Španová, A.; Rittich, B. *Alternative procedure for preparation of Lactobacillus cell lysates*. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. s1011 (s1011 s.) ISSN: 0009-2770.

Přednáška na konferenci:

Fričová, M.; Čuta, R.; Křížová, J.; Španová, A.; Rittich, B. *Simply method of DNA isolation from Lactic acid bacteria*. Book of abstracts. first. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2015. s. 98-99. ISBN: 978-80-214-5228-2.

Publikační činnost:

Fričová, M.; Čuta, R.; Trachtová, Š.; Španová, A.; Rittich, B. *Jednoduchý postup izolace DNA z buněk bakterií rodu Lactobacillus*. Mlékařské listy. 2014, č. 142, s. 3-5.

Bartas, M.; Čutová, M.; Brázda, V.; Kura, P.; Šťastný, J.; Kolomazník, J.; Coufal, J.; Goswami, P.; Červeň, J.; Pečinka, P. *The Presence and Localization of G-Quadruplex Forming Sequences in the Domain of Bacteria*. Molecules. 2019, 24(9). DOI: 10.3390/molecules24091711. ISSN 1420-3049; Impact Factor: 3.060 (2018); 5-Year Impact Factor: 3.380 (2018)

Čutová M., Manta J., Porubiaková O., Kura P., Šťastný J., Jagelská E. B., Goswami P., Brázda V.: Genomic distribution of inverted repeats and G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Odesláno do: *Genomics*. 2019

Projekty:

IS1601/2012: FRVŠ 1601 G4: Identifikace bakterií z přípravku pro biodegradaci lipidů molekulárně biotechnologickými metodami IS1601/2012

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Fričová, M.; Čuta, R.; Trachtová, Š.; Španová, A.; Rittich, B.: Jednoduchý postup izolace DNA z buněk bakterií rodu *Lactobacillus*. *Mlékařské listy*. 2014, č. 142, s. 3-5.

Příloha 2.: Bartas M., Čutová M., Brázda V., Kura P., Šťastný J., Kolomazník J., Coufal J., Goswami J., Červeň J., Pečinka P.: The Presence and Localization of G-Quadruplex Forming Sequences in the Domain of Bacteria. *Molecules*. 2019, 24(9). DOI: 10.3390/molecules24091711

Příloha 3: Čutová M., Manta J., Porubiaková O., Kura P., Šťastný J., Jagelská E. B., Goswami P., Brázda V.: Genomic distribution of inverted repeats and G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Odesláno do: *Genomics*. 2019

Výsledky

Byly testovány dva prebiotické preparáty Orafiti GR a Vivastar Dietary Fibre s obsahem vlákniny z cereálií a psyllia.

1. Kysaný mléčný výrobek s Orafiti GR

Mléko 3,5 % tuku s přidavkem 2 % Orafiti GR bylo vysoce pasterováno (85 °C/ 10 minut) a zaočkováno směsnou mlékařskou kulturou o složení CCDM 144 v dávce 1 %, CCDM 151 v dávce 0,1 % a CCDM 94 v dávce 0,1 %. Zaočkované mléko bylo kultivováno při teplotě 37 °C po dobu 15 hodin. Poté zchlazeno na teplotu 4 °C.

Po kultivaci byla stanovena aktivní kyselost a senzorické vlastnosti kysaného výrobku panelem 3 hodnotitelů (Tab. č. 3).

Tab. 3 Stanovení aktivní kyselosti a zhodnocení senzorických vlastností kysaného nápoje s 2 % Orafiti GR

Aktivní kyselost (pH)	Vzhled a konzistence	Chuť a vůně
4,2	Hustá až viskózní konzistence bez uvolňování syrovátky	Lahodná, mléčná

2. Kysaný mléčný výrobek s Vivastar Dietary Fibre

Mléko 3,5 % tuku bylo vysoce pasterováno (85 °C/10 minut) a zaočkováno směsnou mlékařskou kulturou o složení CCDM 144 v dávce 1 %, CCDM 151 v dávce 0,1 % a CCDM 94 v dávce 0,1 %. Mléko bylo kultivováno při teplotě 37 °C po dobu 15 hodin. Poté zchlazeno na teplotu 4 °C a byla přidána vláknina Vivastar Dietary Fibre s ochucením vanilka v dávce 80 g na 1 l mléka.

Po kultivaci byla stanovena aktivní kyselost a senzorické vlastnosti kysaného výrobku panelem 3 hodnotitelů (Tab. č. 4).

Tab. 4 Stanovení aktivní kyselosti a zhodnocení senzorických vlastností kysaného nápoje s 8 % Vivastar Dietary Fibre

Aktivní kyselost (pH)	Vzhled a konzistence	Chuť a vůně
4,2	Hustá až viskózní konzistence bez uvolňování syrovátky	Lahodná, po ochucení - vanilka

Závěr

Pokusy bylo zjištěno, že kysaný mléčný výrobek s probiotickými mikroorganismy lze obohatit o prebiotickou vlákninu bez negativního vlivu na konzistenci a chuť výrobku. Mléčný výrobek s Orafiti GR je vhodný produkt pro výdej v Milkbaru i pro skladování. Kysaný mléčný výrobek s probiotiky a vlákninou Vivastar Dietary Fibre je možno připravovat pouze jako nápoj pro okamžitou konzumaci pro přímý výdej v Milkbaru.

Uvedené výsledky vznikly za podpory TA02011293, RO0513.

Literatura:

- COLLINS M.D., GIBSON G.R. (1999): Probiotics, prebiotics, nad synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 69, no.5, 1052-1057.
- CRUZ-GUERRERO A. a kol. (2013): Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *J.Sci.Food Agric.*, doi: 10.1002/jsa.6549. (Epub ahead of print)

- FLOCH M.H. (2014): Is there really anything new on dietary fiber in colonic diverticular disease? *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 1542-3565 (14).
- GIBSON G.R., ROBERFROID (2010): Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *JN The Journal of nutrition*. Downloaded from jn.nutrition.org at International Livestock Research Institute.
- RAJASEKARAN A., KALAIVANI M. (2013): Designer foods nad their benefits: A review. *J. Food Sci. Technol.* 50(1):1-16.
- ROBERFROID M. B.(2000): Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Nutr.* Vol. 71, no. 6, 1682-1687.
- SHIDA K., NOMOTO K. (2013): Probiotics as efficient immunopotentiators: Translational role in cancer prevention. *Indian. J. Med. Res.*, 138 (5): 808-14.
- VIEIRA AT, TEIXEIRA MM., MARTINS FS. (2013): The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front. Immunol.*, 4, 445.

Přijato do tisku: 13. 1. 2014

Lektorováno: 4. 2. 2014

JEDNODUCHÝ POSTUP IZOLACE DNA Z BUNĚK BAKTERIÍ RODU LACTOBACILLUS

Fričová, M., Čuta, R., Španová, A., Rittich, B.

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118,612 00 Brno

Simply method of DNA isolation from bacterial cells of genus *Lactobacillus*

Souhrn

Identifikace bakteriální DNA se skládá z několika kroků: příprava DNA ve vhodné kvalitě, která zahrnuje lyzi buněk, extrakci a purifikaci DNA. Poté následuje vlastní identifikace bakterií pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a jiných molekulárně diagnostických metod. Pomocí roztoku pracího prášku (obsahujících enzymy pro degradaci bakteriálních buněk) byly připraveny hrubé lyzáty buněk *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825 a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088. Z hrubých lyzátů buněk byla izolována DNA za použití metody vysolování roztokem NaCl. Kvalita DNA a přítomnost cílové DNA byla ověřena PCR, ve které byly použity primery specifické pro rod *Lactobacillus*.

Klíčová slova: buněčné lyzáty, *Lactobacillus*, DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), NaCl

Abstract

Identification of bacterial DNA consists of several steps: preparation of DNA in a suitable quality. The process includes cell lysis, extraction and purification of DNA followed by identification of the bacterial species using polymerase chain reaction (PCR) and other molecular diagnostic methods. Cell lysates of *Lactobacillus plantarum*

CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, and *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088 were prepared using washing powder solutions (containing enzymes for bacterial cell destruction). DNA was salted out by NaCl solution from these crude cell lysates. The quality of isolated DNA and the presence of the target DNA were verified by PCR using primers specific to the genus *Lactobacillus*.

Key words: cell lysates, *Lactobacillus*, DNA, polymerase chain reaction (PCR), NaCl

1. Úvod

Některé druhy bakterií mléčného kvašení (BMK) jsou po staletí používány při přípravě fermentovaných potravin (mléko a mléčné výrobky, zelenina, maso) a jsou považovány za zcela bezpečné (mají status GRAS - Generally Recognized As Safe) [1]. Jsou důležité pro lidské zdraví, neboť pozitivně ovlivňují funkci gastrointestinálního traktu [2]. Pro praktické využití je důležitá identifikace druhů, tj. jejich přiřazení do stávajících taxonů. Moderní bakteriální taxonomie využívá analýzy makromolekul, zejména DNA. V současné době existuje velké množství molekulárně-biologických metod, pomocí kterých je možno identifikovat cílový mikroorganismus. Nejrozšířenější molekulárně diagnostickou metodou v laboratořích je polymerázová řetězová reakce (PCR), která byla použita i pro identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* [3-4]. Identifikace bakteriální DNA se skládá z několika kroků: lyze buněk, extrakce a purifikace DNA a identifikace bakteriálního druhu pomocí PCR. Prvním krokem je izolace bakteriální DNA v čistotě vhodné pro PCR. Nejvíce používanými postupy izolace DNA jsou fenolová extrakce [5], chelatační činidla [6], adsorpce na magnetické částice [7] a vysolování [8, 9]. Enzymy používané pro přípravu hrubých lyzátů bakteriálních buněk jsou poměrně drahé a náročné na skladování. Tento problém může být vyřešen použitím alternativní metody - použití pracích prášků obsahujících enzymy pro degradaci bakteriálních buněk s následujícím vysolováním DNA.

Cílem práce bylo ověřit vhodnost použití metody přípravy hrubých lyzátů buněk různých druhů rodu *Lactobacillus* působením enzymů z pracího prostředku; z hrubých lyzátů buněk izolovat DNA vysolováním roztokem NaCl a ověřit kvalitu izolované DNA použitím v PCR.

2. Materiál a Metody

2.1. Chemikálie a bakteriální kultury

Primery pro PCR byly syntetizovány ve firmě Generi-Biotech (Hradec Králové, ČR); *TaqI* a *Taq* Purple DNA polymerasy byly od firmy Bio-Tech (Praha, ČR). DNA standard -100 bp žebříček (1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp) pro gelovou elektroforézu byl z Malamité (Moravské Prusy, ČR). Analyzované kmeny *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rham-*

nosus CCM 1825, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088. byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM Brno, ČR). Ostatní chemikálie byly čistoty p.a. a pocházely z běžných komerčních zdrojů. Pro lyzi buněk byl použit roztok pracího prášku Persil zakoupeného v komerční síti.

2.2. Zařízení

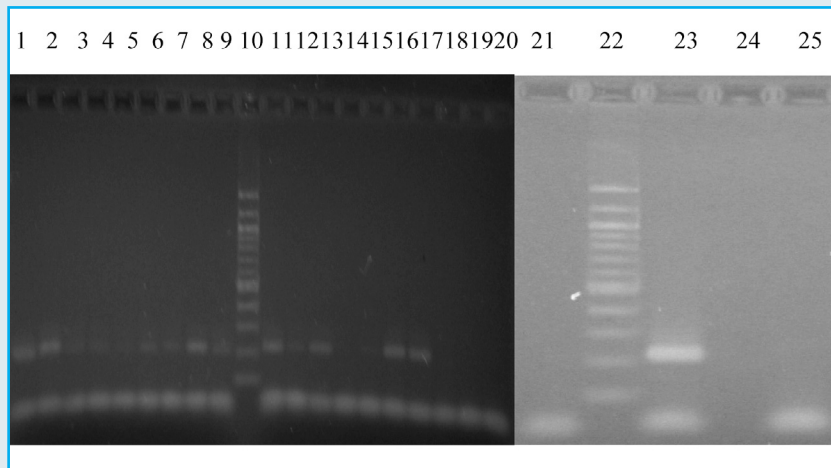
Byly použity následující přístroje a pomůcky: programovatelný cyklátor PTC-100 (MJ Research, Watertown, USA), vana pro horizontální agarosovou gelovou elektroforézu (Bio-Rad, USA), UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramount, USA), UV/Vis NanoPhotometer (Implen, Německo).

2.3. Metody

Jeden ml přes noc narostlé buněčné suspenze byl centrifugován při 15 000 g a pelet byl resuspendován v 1 000 µl roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Po další centrifugaci (14 000 ot/min) byl pelet resuspendován v 500 µl 4% roztoku pracího prášku a inkubován při 55 °C přes noc s cílem připravit hrubé lyzáty buněk. K 500 µl hrubého lyzátu (HL) byl přidán definovaný objem 5,5 M NaCl a sterilní destilované vody do objemu 1 ml (Tabulka 1). Směs byla promíchávána 10 minut, centrifugována při 14 000 otáčkách po dobu 15 minut a odebrán supernatant. K 50 µl supernatantu bylo přidáno takové množství sterilní destilované vody, aby výsledná koncentrace NaCl byla asi 0,3 M, a 2,5 objemu ethanolu. DNA byla srážena 15-30 minut při -20 °C a byla centrifugována 15 minut při 14 000 otáčkách. Sediment byl vysušen v exikátoru a resuspendován v 120 µl TE pufru. Kvalita a přítomnost cílové DNA byla ověřena pomocí PCR, ve které byly použity primery specifické pro rod *Lactobacillus* LBLMA 1-rev (5'- CTC AAAACT AAA CAA AGT TTC - 3') a R16-1 (5'- CTT GTACAC ACC GCC CGT CA - 3'). [3]. Velikost produktu PCR byla asi 250 bp. Při amplifikaci byla použita směs o následujícím složení: PCR voda- 19 µl, 10x reakční pufr kompletní (10x) 2,5 µl; dNTP směs (10 mM) 0,5 µl; primer LbLMA 1-rev (10 pmol/µl) 0,5 µl a primer R16-1 (10 pmol/µl) 0,5 µl; *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/µl) 1 µl a DNA matrice 1 µl. Celkový objem PCR směsi byl 25 µl. Podmínky amplifikace byly následující: denaturace DNA 94 °C/60 s, hybridizace primerů 55 °C/60 s a syntéza komplementárního řetězce 72 °C/120 s. Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 94 °C/5min; v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 72 °C prodloužena na 7 min. Produkty PCR byly detegovány pomocí

Tab. 1 Izolace DNA z hrubých lyzátů (HL) buněk vysolováním s použitím roztoku chloridu sodného

Postup	HL (µl)	5,5 M NaCl (µl)	H ₂ O (µl)	Koncentrace NaCl (M)
1	500	100	400	0,55
2	500	200	300	1,10
3	500	300	200	1,65
4	500	400	100	2,20
5	500	500	0	2,75

Obr. 1 Agarosová elektroforéza produktů PCR

Podmínky: 1,8 % agarosový gel, TBE pufr (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-báze, 1 mM EDTA (pH 8,0)).
 Běhy: 1 - 4: postup 1; 5 - 8: postup 2; 9, 11-13: postup 3; 4 - 17: postup 4; 18 - 21: postup 5; 10, 22: DNA standard (100 bp žebříček); 23: pozitivní kontrola; 25: negativní kontrola; druhy v pořadí: *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825 a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088.

agarosové gelové elektroforézy na 1,8 % agarosovém gelu v TBE pufru (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-báze, 1 mM EDTA, pH 8,0). DNA v gelu byla nabarvena pomocí ethidium bromidu (0,5 µg/ml), gel byl opláchnut ve vodě a fotografován v UV světle (305 nm). Jako DNA standard byl použit 100 bp žebříček. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA (koncentrace 10 ng/µl) izolovaná fenolovou extrakcí [5] z *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088. Jako negativní kontrola byla použita směs PCR bez DNA.

3. Výsledky a diskuse

Byla optimalizována metoda přípravy hrubých lyzátů buněk z různých druhů rodu *Lactobacillus* s následnou izolací DNA vysolováním. K lyzi buněk byl použit 4% roztok pracího prášku. Při izolaci DNA byly testovány různé koncentrace NaCl (0,55 - 2,75 M) (Tabulka 1). Amplifikovatelnost takto izolované DNA byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím primerů specifických pro rod *Lactobacillus*. Výsledky agarosové gelové elektroforézy produktů PCR jsou uvedeny na Obr. 1. Z Obr. 1 je patrné, že byla prokázána přítomnost produktů PCR, to znamená že byla získána amplifikovatelná DNA (dostatečné množství DNA o vhodné kvalitě). Jako nejvhodnější koncentrace NaCl pro izolaci DNA byla zjištěna koncentrace 1,65 M a 2,2 M (postupy 3 a 4 - viz. Tabulka 1). V těchto případech byly po amplifikaci DNA izolované ze všech testovaných bakteriálních druhů detegovány specifické produkty PCR (Obr. 1, běh č. 11-17). Při použití nižších koncentrací NaCl (0,55 a 1,10 M) byly detegovány produkty PCR nižší intenzity (Obr. 1, běh č. 1-9). Postup 5 s 2,75 M NaCl byl vyhodnocen jako nejméně účinný, protože po amplifikaci DNA produkty PCR nebyly detegovány (Obr. 1, běh č. 18 až 21).

Z výsledků vyplývá, že pro lyzi bakteriálních buněk lze použít roztok pracího prášku. Metoda izolace DNA z lyzátu buněk vysolováním roztokem chloridu sodného se jeví

jako vhodná pro lyzi buněk rodu *Lactobacillus*. Rozdíly v intenzitě produktů PCR získaných po amplifikaci DNA izolované vysolováním stejnou koncentrací NaCl mohou odrážet rozdíly v lyzi buněk pracím práškem. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdíly ve složení buněčných stěn testovaných druhů. Výsledky dosažené uvedenými postupy jsou srovnatelné s výsledky metod izolace DNA magnetickými nosiči či fenolovou extrakcí, při nichž se při přípravě hrubých lyzátů buněk používají purifikované enzymy. Výhodou této metody je skutečnost, že se nemusí pracovat s organickými toxickými látkami.

4. Závěr

Z hrubých lyzátů buněk různých druhů rodu *Lactobacillus* připravených lyzí pracím práškem lze vysolováním izolovat DNA amplifikovatelnou v PCR. Metoda je jednoduchá, rychlá a levná, vhodná zejména pro izolaci bakteriální DNA z velkého množství vzorků v kvalitě dostatečné pro PCR.

Poděkování

Tato práce byla podporována vnitřním grantem FCH-S-13-1912.

Literatura


- [1] Bernardeau M., Vernoux, V. S., Dubernet H., Guégen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126 (2008) 278-285.
- [2] Walter J. Ecological Role of *Lactobacilli* in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 4985-4996.
- [3] Dubernet S., N Desmasures N., M Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* 214 (2002) 271-275.
- [4] Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjärvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatosava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 297-303.
- [5] Sambrook J., Russell D. W. L. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Laboratory Harbor Press, 2001.
- [6] Giraffa G., Rossetti L., Neviani E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods* 42 (2000) 175-184.
- [7] Rittich, B., Španová, A. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2472-2485.
- [8] Nasiri H., Forouzandeh M., Rasaei M. J., Rahbarzadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J. Clin. Lab. Anal.* 19 (2005) 229-232.
- [9] d'Angelo F., Santillo A., Sevi A., Albenzio M. A simple salting-out method for DNA Extraction from Milk Somatic Cells. *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 3550-3552.

Přijato do tisku: 10. 1. 2014

Lektorováno: 10. 2. 2014

Article

The Presence and Localization of G-Quadruplex Forming Sequences in the Domain of Bacteria

Martin Bartas ^{1,†}, Michaela Čutová ^{2,†}, Václav Brázda ^{2,3}, Patrik Kaura ⁴, Jiří Šťastný ^{4,5}, Jan Kolomazník ⁵, Jan Coufal ³, Pratik Goswami ³, Jiří Červeň ¹ and Petr Pečinka ^{1,*}

¹ Department of Biology and Ecology/Institute of Environmental Technologies, Faculty of Science, University of Ostrava, 710 00 Ostrava, Czech Republic; dutartas@gmail.com (M.B.); jiri.cerven@osu.cz (J.Č.)

² Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; xcficova@fch.vut.cz (M.Č.); vaclav@ibp.cz (V.B.)

³ Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic; jac@ibp.cz (J.C.); pratikgoswami@ibp.cz (P.G.)

⁴ Faculty of Mechanical Engineering, Brno University of Technology, Technická 2896/2, 616 69 Brno, Czech Republic; 160702@vutbr.cz (P.K.); stastny@fme.vutbr.cz (J.Š.)

⁵ Department of Informatics, Mendel University in Brno, Zemedelska 1665/1, 61300 Brno, Czech Republic; jan.kolomaznik@gmail.com

* Correspondence: petr.pecinka@osu.cz; Tel.: +420-553-46-2318

† These authors contributed equally to this work.

Received: 16 April 2019; Accepted: 1 May 2019; Published: 2 May 2019



Abstract: The role of local DNA structures in the regulation of basic cellular processes is an emerging field of research. Amongst local non-B DNA structures, the significance of G-quadruplexes was demonstrated in the last decade, and their presence and functional relevance has been demonstrated in many genomes, including humans. In this study, we analyzed the presence and locations of G-quadruplex-forming sequences by G4Hunter in all complete bacterial genomes available in the NCBI database. G-quadruplex-forming sequences were identified in all species, however the frequency differed significantly across evolutionary groups. The highest frequency of G-quadruplex forming sequences was detected in the subgroup *Deinococcus-Thermus*, and the lowest frequency in *Thermotogae*. G-quadruplex forming sequences are non-randomly distributed and are favored in various evolutionary groups. G-quadruplex-forming sequences are enriched in ncRNA segments followed by mRNAs. Analyses of surrounding sequences showed G-quadruplex-forming sequences around tRNA and regulatory sequences. These data point to the unique and non-random localization of G-quadruplex-forming sequences in bacterial genomes.

Keywords: G-quadruplex; bacteria; bioinformatics; *deinococcus*; G4Hunter

1. Introduction

The discovery of the B-DNA structure by Crick and Watson started a rapid growth in genetic and molecular biology research [1]. However, it is now clear that, apart from this well-known double helical DNA structure, other forms of secondary structure participate in various basic processes [2]. The presence of various local DNA structures including cruciforms [3], quadruplexes [4] and triplexes [5] has been demonstrated by various methodological approaches. For example, G-quadruplexes (G4) were studied by crystallography as far back as 1962 [6]. G4s are secondary structures formed by guanine rich sequences which are widespread in DNA and RNA [4]. The building block for a G4 is a guanine quartet formed by G:C Hoogsteen base pairs (Figure 1). G4 formation requires the presence of monovalent cations such as Na⁺ and K⁺ [7]. Formation of this structure regulates various processes including gene expression [8], protein translation [9] and proteolysis pathways [10] in both prokaryotes

and eukaryotes. In human, G4s are formed in various regions including sub-telomeres, gene bodies and gene regulatory regions [11] and in telomere regions to suppress degradation and maintain genomic stability [12]. Formation of G4s in this region decreases telomerase activity and decreases the chances of cancer development [13,14]. In addition, the proto-oncogene *MYC* is bound by nucleolin in its hypersensitive region III and enhances G4 folding and suppresses *MYC* transcription [15]. Therefore, it has been suggested that anticancer therapy will be possible by targeting G4s [16–18]. Moreover, it has been demonstrated that G4-stabilizing ligands modulate gene transcription [11]. It is already known that clusters of G4-forming sequences induce gene expression and that they are distributed near promoters and 5'UTRs. Replication-dependent DNA damage evidenced by G4 ligands have also been discovered in tumor suppressor genes and oncogenes [19]. Another potential therapeutic option is to target G4-binding proteins. Many proteins are known to bind to G4s, including some proteins important in cancer [20,21]. Moreover, novel G4 binding proteins have been suggested, sharing the NIQI amino acid motif (RGRGR GRGGG SGGSG GRGRG) [22].

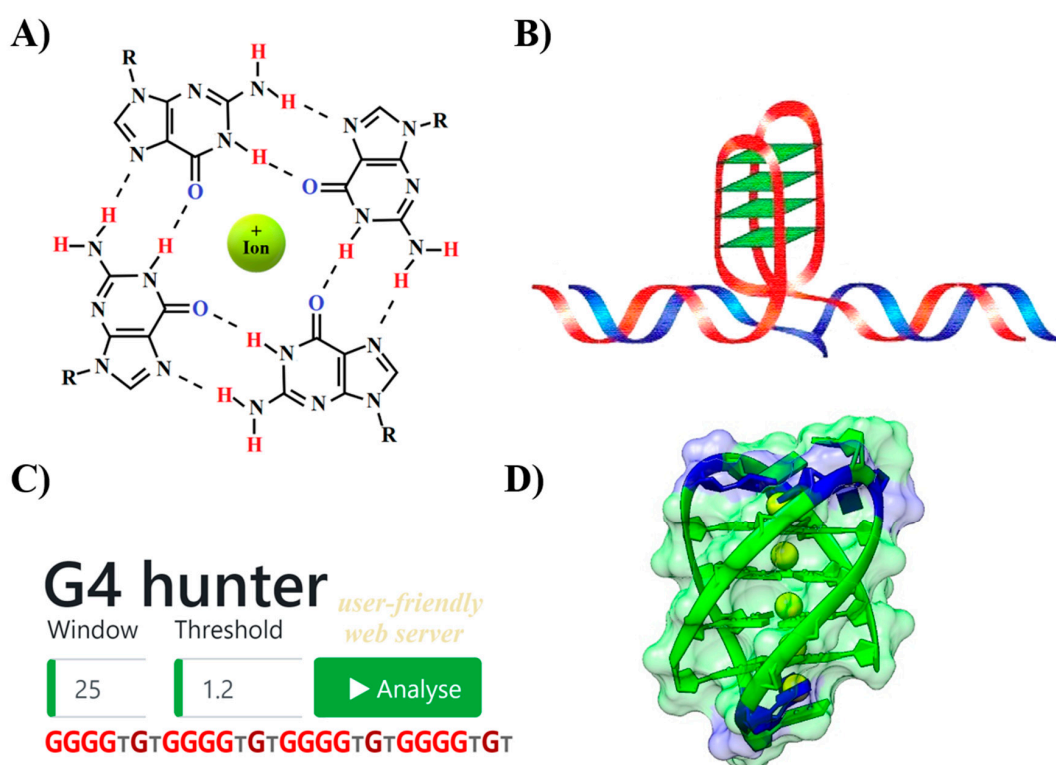


Figure 1. G-quadruplexes: (A) guanine tetrad stabilized by Hoogsten base pairing and positively charged central ion; (B) schematic drawing of intramolecular G4 structure arising from double stranded DNA; (C) G4Hunter, a new user-friendly web server for high throughput analyses of G4-forming sequences in DNA; and (D) 3D model of intramolecular antiparallel G4 formed from the sequence (5'-GGGGTGTGGGGTGTGGGGTGTGGGGTGTGGGGTGT-3') found in *Microcystis aeruginosa* built using 3D-NuS webserver [23].

Due to the roles of G4s in regulating basic cellular processes, it is essential to identify the location of G4s in genomes. Several algorithms for detecting expected matching patterns for G4 formation are already described. The first algorithm [$G_nN_mG_nN_oG_nN_pG_n$] was created by Balasubramanian and colleagues [24] and the second algorithm considering occurrence of repeating unit G_n ($n \geq 2$) was created by the group of Maizels [25]. Nevertheless, these algorithms only produce binary (yes/no; match/no match) results, rather than the quantitative analyses that are mandatory for correlation with quadruplex strength metrics. G4Hunter was developed to overcome this limitation, in which G4 propensity is calculated depending on G richness and G skewness [26].

Bacterial genetic material is stored mostly in circular chromosomes and plasmids [27]. It was demonstrated that secondary structures in bacterial genomes are responsible for genomic stability [28]. In addition, G4 structures are more stable than double stranded DNA due to slower unfolding kinetics [29]. Nevertheless, fewer studies on role of G4 in bacterial survival and virulence have been carried out [30]. A comparative functional analysis by Pooja et al. revealed that open reading frame (ORF) formulated amino acids biosynthesis and signal transduction are restrained by/controlled by G4 DNA in prokaryotes [31]. There have been many reports on the role of G4s in eukaryotes over many years [32], although advances in prokaryotic G4s are not fully elucidated [33].

The formation of an intramolecular G4 requires the presence of a loop sequence between the G-tracts [34] and the density of G4 therefore broadly correlates with GC content. The GC content in bacterial genomes varies remarkably, from 17% to 75% [35]. It was demonstrated that G4 forming sequences are enriched and biased around transcription start sites of genes in the order Deinococcales [36]. Another function of G-tracts is in sustaining and maintaining duplex stability at higher temperatures in thermophiles; for example, *Thermus aquaticus* has a GC content of 68% [37]. Interestingly, the soil bacterium *Paracoccus denitrificans* contains 494 G4-forming sequences, which play roles in digestion of NO₃⁻ through G4 formation upstream of *NasT* [38]. The presence of G4-forming motifs in genes *hsdS*, *recD*, and *pmrA* of *Streptococcus pneumoniae* participate in host–pathogen interactions [30]. Such observations show the significance role of G4 in bacteria and also in eukaryotic cell organelles such as chloroplasts and mitochondria with circular DNAs that originated from prokaryotic organisms. Several papers show the importance of local DNA structures in mitochondrial DNA including G4 using G4Hunter [26] and inverted repeats [39] using palindrome analyzer [40]. Similarly, cruciforms exist in various regulatory regions in chloroplast DNA [41].

The presence of G4 in bacteria remains poorly understood. In our study, we comprehensively analyzed the presence and locations of G4 in 1627 bacterial genomes using G4Hunter. These data bring more information about evolutionary changes of G4 frequency between phyla and provide evidence for the importance of G4 in prokaryotes.

2. Results

2.1. Variation in Frequency for G4-forming Sequences in Bacteria

We analyzed the occurrence of putative G4 sequences (PQS) by G4Hunter in all 1627 known bacterial genomes. The length of bacterial genomes in the dataset varies from 298 kbp to 20.20 Mbp. The GC content average is 50.44%, with minimum 20.2% for *Buchnera aphidicola* (Gammaproteobacteria) and maximum 74.7% for *Corynebacterium sphenisci* (Actinobacteria). Using standard values for G4Hunter algorithm—window size 25 and G4Hunter score above 1.2—we found 9,202,364 PQS in all 1547 bacteria with 1627 genomes (some bacteria have two genomes). The most abundant PQS are those with G4Hunter scores of 1.2–1.4 (97.9% of all PQS), much less abundant are PQS with G4Hunter scores 1.4–1.6 (1.96% of all PQS), followed by 1.6–1.8 (0.128% of all PQS) and 1.8–2.0 (0.0056% of all PQS) and the lowest number of PQS is above G4Hunter score 2 (0.0009% of all PQS). In general, a higher G4Hunter score means a higher probability of G4s forming inside the PQS [26]. A summary of all PQS found in ranges of G4Hunter score intervals and precomputed PQS frequencies per 1000 bp is shown in Table 1.

According to NCBI taxonomy classification, the fully sequenced organisms of Bacteria domain are divided into 18 groups (6 with 10 or more sequenced genomes) and 39 subgroups (14 with 10 or more sequenced genomes), as shown in the phylogenetic tree (Figure 2). For statistical analyses, we used only groups with 10 or more sequenced genomes (highlighted by colors).

The number of all analyzed sequences in individual phylogenetic categories, together with median genome length, shortest genome, longest genome, mean, minimal and maximal observed frequency of PQS per 1000 bp and total PQS counts are shown in Table 2. Five subgroups (Actinobacteria, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria) show >60% GC

content. On the other side, three subgroups (Spirochaetia, Thermotogae and Tenericutes) show < 40% GC content.

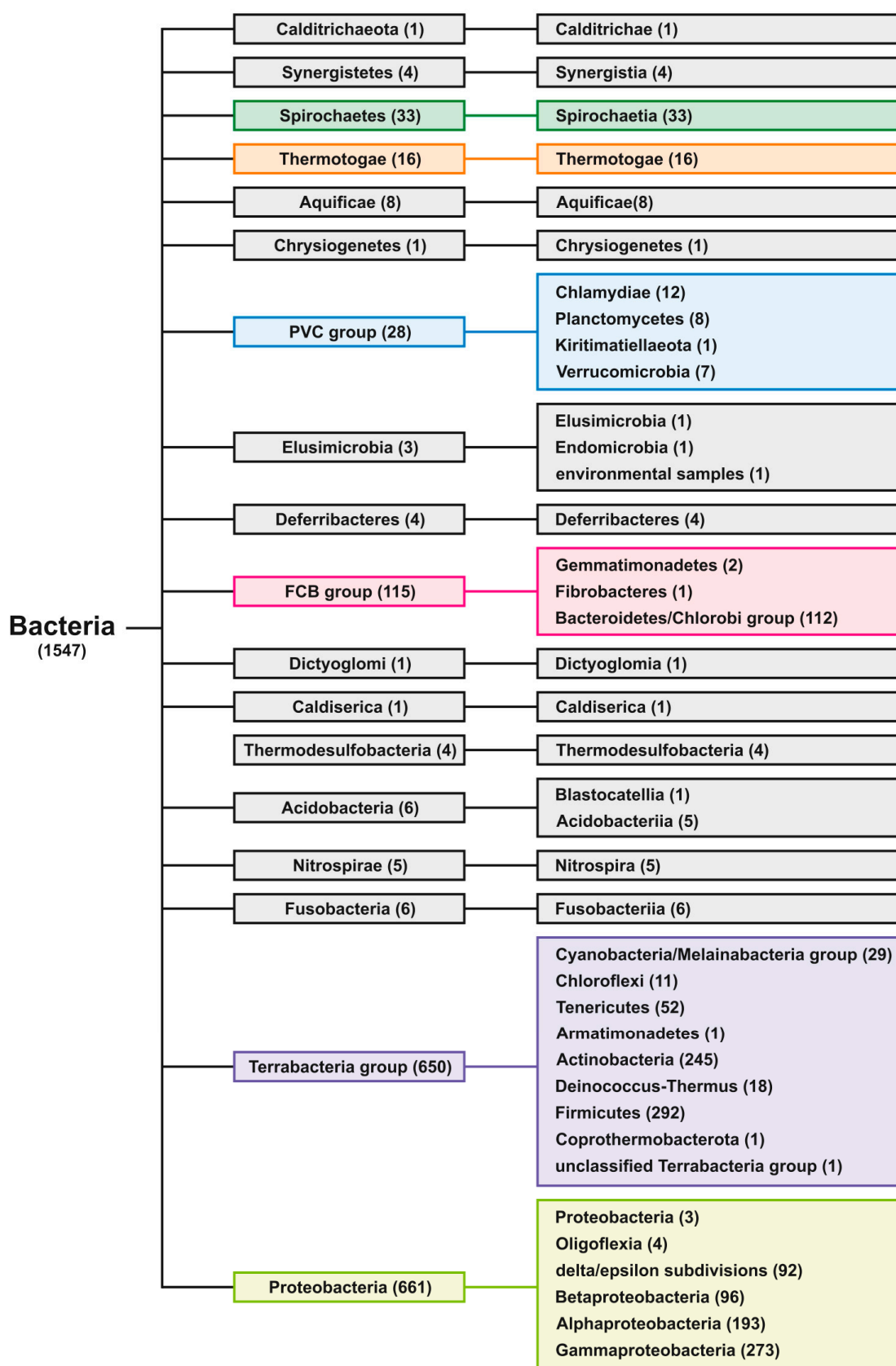


Figure 2. Phylogenetic tree of inspected Bacterial Groups and Subgroups.

Table 1. Total number of PQS and their resulting frequencies per 1000 bp in all 1547 representative bacteria, grouped by G4Hunter score. Frequency was computed by using total number of PQS in each category divided by total length of all analyzed sequences and multiplied by 1000.

Interval of G4Hunter Score	Number of PQS in Dataset	PQS Frequency per 1000 bp
1.2–1.4	9,009,593	1.315033
1.4–1.6	180,395	0.025058
1.6–1.8	11,779	0.00155
1.8–2.0	511	0.000055
2.0–more	86	0.000009

Table 2. Genomic sequences sizes, PQS frequencies and total counts. Seq (total number of sequences), Median (median length of sequences), Short (shortest sequence), Long (longest sequence), GC % (average GC content), PQS (total number of predicted PQS), Mean f (mean frequency of predicted PQS per 1000 bp), Min f (lowest frequency of predicted PQS per 1000 bp), Max f (highest frequency of predicted PQS per 1000 bp). Colors correspond to phylogenetic tree depiction.

Domain	Seq	Median	Short	Long	GC%	PQS	Mean f	Min f	Max f
Bacteria	1627	3,307,820	83,026	13,033,779	50.6	9,202,364	1.342	0.013	14.213
Group	Seq	Median	Short	Long	GC%	PQS	Mean f	Min f	Max f
Spirochaetes	38	2,646,038	277,655	4,653,970	39.7	87,109	0.809	0.079	6.668
Thermotogae	16	2,150,379	1,884,562	2,974,229	39.1	13,617	0.395	0.149	0.812
PVC group	28	2,917,407	1,041,170	9,629,675	50.7	198,358	1.646	0.388	4.802
FCB group	117	3,914,632	605,745	9,127,347	42.3	302,949	0.608	0.013	2.746
Terrabacteria	659	3,018,755	91,776	11,936,683	50.4	4,766,517	1.601	0.016	14.213
Proteobacteria	724	3,551,512	83,026	13,033,779	53.4	3,688,101	1.276	0.025	5.507
Other	45	2,157,835	1,012,010	6,237,577	44.3	145,713	1.103	0.062	5.855
Subgroup	Seq	Median	Short	Long	GC%	PQS	Mean f	Min f	Max f
Spirochaetia	38	2,646,038	277,655	4,653,970	39.7	87,109	0.809	0.079	6.668
Thermotogae	16	2,150,379	1,884,562	2,974,229	39.1	13,617	0.395	0.149	0.812
Chlamydiae	12	1,168,953	1,041,170	3,072,383	40.3	12453	0.646	0.388	0.957
Bacteroidetes/Chlorobi	114	3,878,527	605,745	9,127,347	41.9	282,516	0.585	0.013	2.746
Cyanobacteria/Melainae	29	5,315,554	1,657,990	9,673,108	42.6	193,894	1.247	0.201	6.004
Chloroflexi	12	2,333,610	125,2731	5,723,298	60	62,688	1.89	1.223	3.222
Tenericutes	52	981,001	564,395	1,877,792	28	6460	0.136	0.016	0.834
Actinobacteria	246	3,960,961	775,354	11,936,683	66.2	3,590,884	2.821	0.143	8.556
Deinococcus-Thermus	18	2,895,913	2,035,182	3,881,839	66.8	311,949	6.626	1.885	14.213
Firmicutes	298	2,835,823	91,776	8,739,048	40.8	579,740	0.56	0.064	6.587
delta/epsilon subdiv.	92	3,136,746	1,457,619	13,033,779	50	807,281	1.681	0.034	5.282
Betaproteobacteria	110	3,763,620	820,037	6,987,670	60.6	585,984	1.306	0.195	4.007
Alphaproteobacteria	213	3,424,964	83,026	9,207,384	61.5	126,134	1.764	0.051	5.507
Gammaproteobacteria	302	3,777,066	298,471	7,783,862	48.8	31,686	0.799	0.025	4.264
other	75	2,406,157	1,012,010	9,629,675	48.4	432,683	1.406	0.0616	5.855

Mean frequency for all bacterial genomes was 1.342 PQS per 1000 bp. The lowest mean frequency is for Thermotogae (0.395) and the highest for the PVC group (1.646), followed by Terrabacteria (1.601). On the subgroup level, the lowest mean frequency was found in Tenericutes (0.136) and the highest in Deinococcus-Thermus (6.626), followed by Actinobacteria (2.821). The very highest PQS frequency of 14.213 PQS/kbp was found in *Thermus oshimai* JL-2 (subgroup Deinococcus-Thermus) and the lowest frequency (0.013 PQS/kbp) in *Lacinutrix venerupis* (subgroup Bacteroidetes/Chlorobi) containing only 40 PQS in its 31,923,99 bp genome (0.0125 PQS/kbp). Detailed statistical inter group and inter subgroup comparisons are depicted in Supplementary Material S5 (SM_05).

Detailed statistical characteristics for PQS frequencies (including mean, variance, and outliers) are depicted in boxplots for all inspected subgroups (Figure 3).

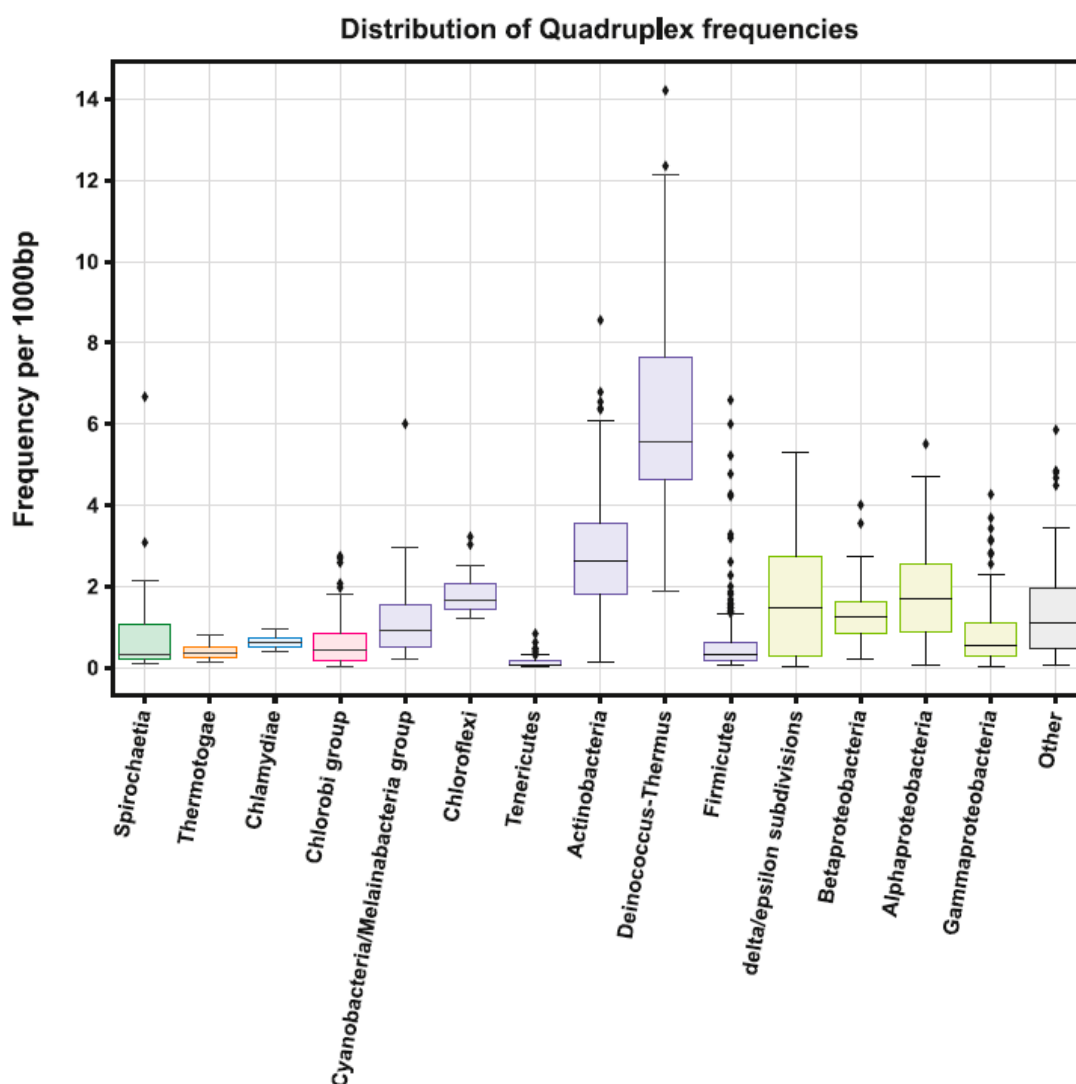


Figure 3. Frequencies of PQS in subgroups of the analyzed bacterial genomes. Data within boxes span the interquartile range and whiskers show the lowest and highest values within 1.5 interquartile range. Black diamonds denote outliers.

We visualized the relationship between %GC content in genomes with the frequency of PQS (Figure 4). In general, PQS frequencies usually correlate with GC content, however there are many exceptions to this rule. Organisms with high PQS frequencies relative to their GC content (over 50% of the maximal observed PQS frequency, Figure 4) are highlighted in color; the whole figure is separated into smaller segments according to inspected G4Hunter score intervals. Nearly all of the 10 outliers belong to the group Terrabacteria, except *Spirochaeta thermophila* DSM 6578 (group Spirochaetes). From the Terrabacteria group, six outliers belong to the small subgroup Deinococcus-Thermus (*Thermus oshimai* JL-2, *Thermus brockianus*, *Thermus aquaticus* Y51MC23, *Thermus scotoductus* SA-01, *Marinithermus hydrothermalis* DSM 14884, and *Deinococcus puniceus*), two outliers belong to the subgroup Actinobacteria (*Verrucosipora maris* AB-18-032 and *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941) and one outlier comes from the subgroup Cynobacteria/Melainabacteria (*Microcystis aeruginosa* NIES-843).

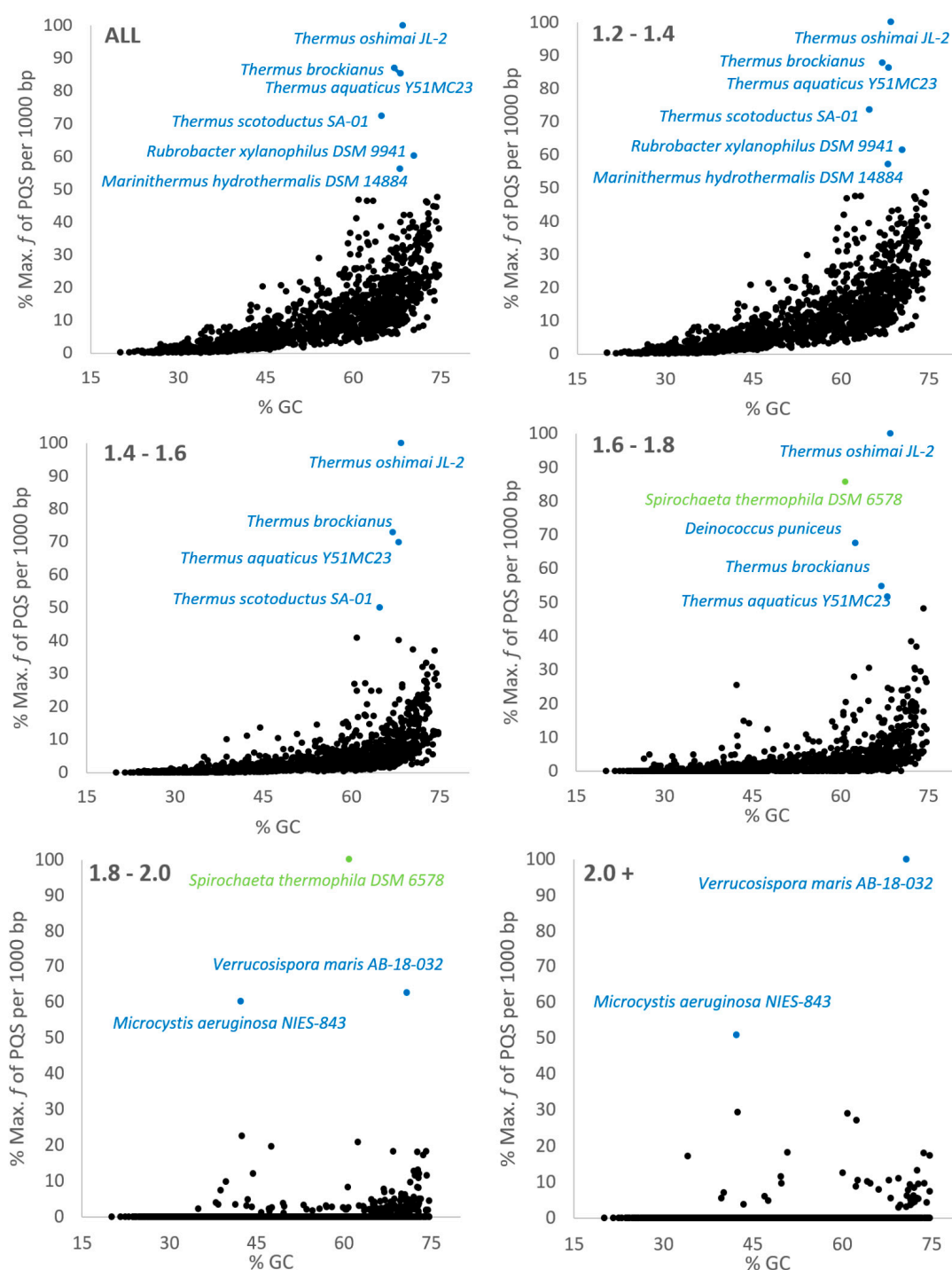


Figure 4. Relationship between observed frequency of PQS per 1000 bp and GC content in all analyzed prokaryotic sequences in various G4 Hunter score intervals. In each G4Hunter score interval miniplot, frequencies were normalized according to the highest observed frequency of PQS. Organisms with max. frequency per 1000 bp greater than 50% are described and highlighted in color.

2.2. Localization of PQS in Genomes

To evaluate the position of PQS in bacterial genomes, we downloaded the described “features” of all bacterial genomes and analyzed the presence of all PQS in each annotated sequences and its close proximity (100 bp before and after feature annotation). PQS frequencies around annotated genome sites are shown in Figure 5. The highest PQS frequencies are before and after transfer RNA

(tRNA), then inside transfer-messenger RNA (tmRNA) and inside ribosomal (rRNA). The lowest PQS frequencies were noticed before and after sequence-tagged sites (STS), then after and before rRNA and after miscellaneous features. If we consider only “inside” regions of inspected features, the differences between features are much smaller than within “before” and “after” regions.

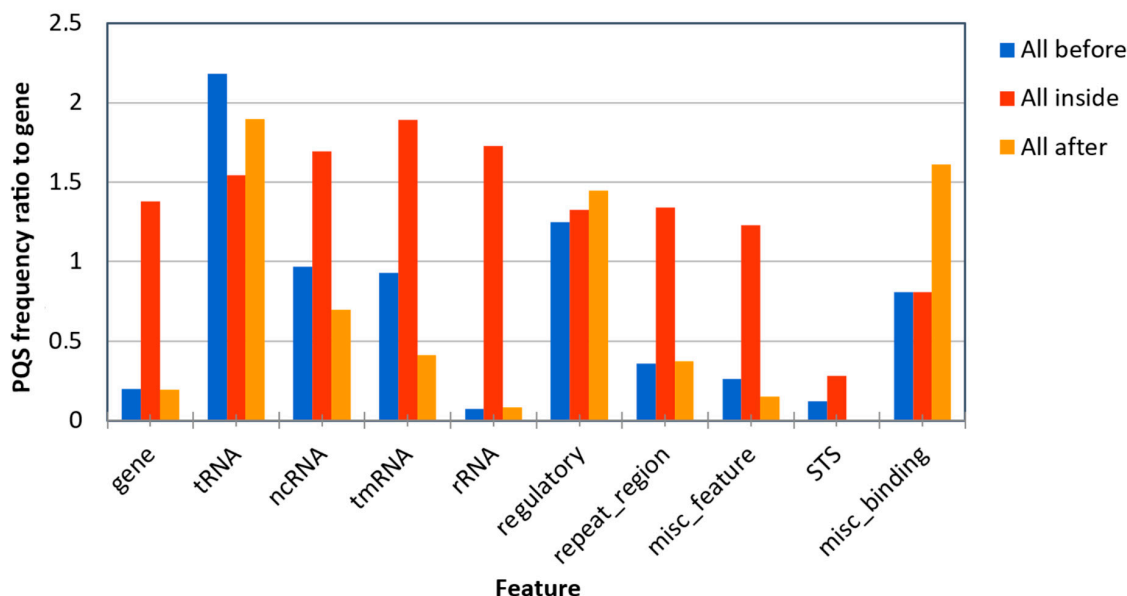


Figure 5. Differences in PQS frequency by DNA locus. The chart shows PQS frequencies according to “gene” annotation and other annotated locations from the NCBI database. We analyzed the frequencies of all PQS within (inside), before (100 bp) and after (100 bp) annotated locations.

As shown in Figure 5, there is no straight pattern in PQS occurrence in all annotated sequences but, in some groups, there are certain PQS distributions. For example, inside rRNA, tmRNA, ncRNA, misc_features, genes and repeat regions, there is higher amount of PQS in annotated sequences, but these PQS are not frequently present in DNA situated before and after these annotated sequences. In contrast, there is almost the same distribution of PQS before, inside and after annotated sequences in tRNA and regulatory groups.

3. Discussion

It has been demonstrated that G4s could be used as targets for therapy [42]. G4 ligands are suggested as a target in cancer [43] and show antiparasitic activity for *Trypanosoma brucei* binding to a G4 structure [44]. Therefore, it has been proposed that G4 sequences in bacterial genomes represent novel and promising targets for antimicrobial therapy [33], and dinuclear polypyridylruthenium(II) complexes are active against drug-resistant bacteria including Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-resistant *Enterococcus* [45,46]. Dinuclear ruthenium complexes are relatively well-characterized G4 DNA binding agents [47–49]. Interestingly, we found large numbers of PQS with G4Hunter scores greater than 1.8 in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microcystis aeruginosa* is a ubiquitous cyanobacterium living in eutrophic fresh water, which produces harmful hepatotoxins and neurotoxins, and can cause economic loss and damage to the ecosystem [50]. Our analysis indicates that this organism contains unusual and perfectly repeated PQSs (for example, DNA repeat of (GGGGTGT)₅₈). Therefore, we hypothesize that this organism could be very sensitive to treatment with specific G4 binding compounds to inhibit its growth, as a possible alternative to commonly used algicides (the human genome does not contain these GGGGTGT repetitions). On the other hand, the lowest mean frequency of PQS was found in Terrabacteria subgroup Tenericutes (0.136 PQS/kbp) with the lowest average GC content (28%). The subgroup Tenericutes includes the genus *Mycoplasm*a with many pathogens of clinical importance. On the other hand, a G4 was found in the promoter region

of *Mycobacterium tuberculosis* and G4 ligands inhibited *M. tuberculosis* growth in the low micromolar range [51]. Therefore, the presence of a G4 could be important not only in antiviral [42,52] but also in antibacterial therapy. According to a recent study by Ding et al., eukaryotic organisms have similar PQS frequencies of 0.3 PQS per 1000 bp, whereas prokaryote frequencies are more diverse [36]. Based on our analysis, prokaryote PQS frequencies span a range of 0.013 (*Lacinutrix venerupis*) to 14.213 (*Thermus oshimai* JL-2) PQS per 1000 bp. A similar observation was shown by Quadparser algorithm and leads to the hypothesis that thermophilic organisms are enriched with PSQs due to their living at high temperatures [36]. However, similar enrichment has been demonstrated also for organisms with resistance to other stress factors such as radioresistance [53,54], thus the direct correlation between temperature and G4 presence is not supported by these finding. Validation of the G4Hunter score was made based on biophysical measurements at room temperature [26], therefore the number of G4 sequences in thermophiles could be overestimated, especially for those sequences with G4Hunter scores close to 1.2. Moreover, the mostly thermophilic and hyperthermophilic bacteria in phylum Thermotogae strains has one of the lowest PSQ frequencies. Thus, it seems that Gram-negative thermophilic bacteria evolved according to G4 structures in a completely different way than Gram-positive thermophilic bacteria, and that correlation among thermophiles and G4s depends on the phylum. Contrary to the enrichment of PQS near transcriptional start sites (TSS), 5'-3'UTR sequences and coding regions in eukaryotes [36], our analyses showed the highest PQS frequencies inside tmRNA, ncRNA and rRNA regions in prokaryotes (Figure 5). tmRNAs play a key role in the so-called ribosome rescue process, if ribosomes cannot finish translation, e.g. due to lost stop codon in translated mRNA. The physiological role of ncRNAs in prokaryotes is not fully elucidated, although they are considered to be important regulators of pathogenic processes by controlling virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae* [55]. The comparison of PQS frequencies between different studies could be complicated due to various PQS thresholds and algorithms. In our study, we used the state-of-the-art algorithm, G4Hunter, developed by Mergny and colleagues. This algorithm takes into account G-richness and G-skewness and has been experimentally validated [26]. Moreover, the current G4Hunter web version allows easy analyses of multiple genomes [56] and our comprehensive analysis showed the broad variations of PQS frequencies and their locations in bacterial genomes.

4. Methods

4.1. Selection of DNA Sequences

The set of all complete bacterial genomic DNA sequences was downloaded from the Genome database of the National Center for Biotechnology Information [57]. We used for our analyses only completely assembly level and we have selected one genome (representative) for each species (Supplementary Material S1 (SM_01)) to avoid non-complete sequences and duplications. In total, we analyzed the presence of G4 sequences in 1627 genomes from the domain Bacteria, representing 5886 Mbp.

4.2. Process of Analysis

We used the computational core of our DNA analyzer software written in Java [40]. For these analyses, we used the G4Hunter algorithm implementation [56]. Parameters for G4Hunter was set to "25" for window size and G4 score above 1.2. An example of a putative G4 sequence found using such search criteria is provided in Supplementary Material S2 (SM_02). The overall results for each species group contained a list of species with size of genomic DNA and number of putative G4 sequences found (Supplementary Material S3 (SM_03)). These data were processed by Python jupyter using Pandas (contains statistical tools). Graphs were generated from the Pandas tables using "seaborn" graphical library.

4.3. Analysis of Putative G4 Sequences Around Annotated NCBI Features

We downloaded the feature tables from the NCBI database along with the genomic DNA sequences. Feature tables contain annotations of known features found in the DNA sequence. We analyzed the occurrence of G4-forming sequences inside and around (before and after) recorded features. Features were grouped by the name stated in the feature table file. From this analysis, we obtained a file with feature names and numbers of putative G4 forming sequences found inside and around features for each group of species analyzed. Search for putative G4 forming sequences took place in a predefined feature neighborhood (we used ± 100 bp—this figure is important for calculation of putative G4-forming sequence frequencies in feature neighborhoods) and inside feature boundaries. We calculated the amount of all predicted putative G4-forming sequences in regions before, inside and after features. An example of categorizing a putative G4-forming sequence according to its overlap with a feature or feature's neighborhood is shown in Supplementary Material S2 (SM_02). Further processing was performed in Microsoft Excel and the data are available as Supplementary Material S4 (SM_04).

4.4. Phylogenetic Tree Construction

Exact taxid IDs of all analyzed groups were obtained from Taxonomy Browser via NCBI Taxonomy Database [58], downloaded to phyloT: a tree generator (<http://phylot.biobyte.de>) and a phylogenetic tree was constructed using function “Visualize in iTOL” in Interactive Tree of Life environment [59]. The resulting tree is shown in Figure 2.

4.5. Statistical Analysis

Statistical evaluations of differences in G4-forming sequences in phylogenetic groups were made by Kruskal–Wallis test in STATISTICA, with p -value cut-off 0.05; data are available in Supplementary Material S5 (SM_05).

5. Conclusions

In this research, we analyzed the presence of PQS in bacterial genomes. PQS were identified in all species, but the number of PQS differ remarkably among individual subgroups, showing evolutionary adaptations connected with G4. While the highest frequency of PQS was detected in Gram-positive extremophiles *Deinococcus-Thermus* subgroup, the lowest PQS frequency was found in Gram-negative thermophilic bacteria in *Bacteroidetes/Chlorobi* subgroup. Thus, it seems that evolution of these subgroups was driven by different strategies. PQS are enriched in ncRNA segments followed by mRNAs; analyses of surrounding sequences showed PQS enrichment also around tRNA and regulatory sequences. These data point to the unique and non-random localization of PQS in bacterial genomes.

Supplementary Materials: The supplementary material are available online. Supplementary Material S1 (SM_01): The accession codes and phylogenetic classification of all 1627 representative prokaryotic complete genomic DNA sequences, Supplementary Material S2 (SM_02): Example putative G4 sequence and predefined feature neighborhood, Supplementary Material S3 (SM_03): Overall results of PQS frequencies found in each analyzed genomic sequence (group or subgroup) together with GC content, sequence length and other parameters, Supplementary Material S4 (SM_04): Detailed results of PQS occurrence around defined genomic features, Supplementary Material S5 (SM_05): Statistical evaluations of differences in G4-forming sequences in phylogenetic groups

Author Contributions: Conceptualization, M.B. and P.P.; Data curation, P.K.; Formal analysis, M.B. and P.K.; Funding acquisition, P.P.; Investigation, M.Č. and J.C.; Methodology, V.B.; Project administration, P.P.; Resources, M.Č., J.Š.; and J.K.; Software, P.K., J.Š.; and J.K.; Supervision, J.Č. and P.P.; Validation, V.B.; Visualization, M.B., P.K. and P.G.; Writing—original draft, M.B., M.Č., V.B., J.C. and P.G.; and Writing—review and editing, J.Č.

Funding: This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (18-15548S); the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic in the “National Feasibility Program I” (LO1208 TEWEP); EU structural funding Operational Programme Research and Development for innovation, project No. CZ.1.05/2.1.00/19.0388; and project SGS/09/PrF/2019 financed by University of Ostrava.

Acknowledgments: We thank Philip J. Coates for proofreading and editing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Watson, J.D.; Crick, F.H. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **1953**, *171*, 737–738. [[CrossRef](#)]
2. Szlachta, K.; Thys, R.G.; Atkin, N.D.; Pierce, L.C.T.; Bekiranov, S.; Wang, Y.-H. Alternative DNA secondary structure formation affects RNA polymerase II promoter-proximal pausing in human. *Genome Biol.* **2018**, *19*, 89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Brázda, V.; Laister, R.C.; Jagelská, E.B.; Arrowsmith, C. Cruciform structures are a common DNA feature important for regulating biological processes. *BMC Mol. Biol.* **2011**, *12*, 33. [[CrossRef](#)]
4. Sun, Z.-Y.; Wang, X.-N.; Cheng, S.-Q.; Su, X.-X.; Ou, T.-M. Developing Novel G-Quadruplex Ligands: From Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid–Protein Interaction. *Molecules* **2019**, *24*, 396. [[CrossRef](#)]
5. Nelson, L.D.; Bender, C.; Mannsperger, H.; Buerge, D.; Kambakamba, P.; Mudduluru, G.; Korf, U.; Hughes, D.; Van Dyke, M.W.; Allgayer, H. Triplex DNA-binding proteins are associated with clinical outcomes revealed by proteomic measurements in patients with colorectal cancer. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gellert, M.; Lipsett, M.N.; Davies, D.R. Helix Formation by Guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 2013–2018. [[CrossRef](#)]
7. Harkness, R.W.; Mittermaier, A.K. G-quadruplex dynamics. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2017**, *1865*, 1544–1554. [[CrossRef](#)]
8. Siddiqui-Jain, A.; Grand, C.L.; Bearss, D.J.; Hurley, L.H. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11593–11598. [[CrossRef](#)]
9. Lee, S.C.; Zhang, J.; Strom, J.; Yang, D.; Dinh, T.N.; Kappeler, K.; Chen, Q.M. G-Quadruplex in the NRF2 mRNA 5' Untranslated Region Regulates De Novo NRF2 Protein Translation under Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* **2016**, *37*, e00122–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Endoh, T.; Kawasaki, Y.; Sugimoto, N. Stability of RNA quadruplex in open reading frame determines proteolysis of human estrogen receptor α . *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6222–6231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lam, E.Y.N.; Beraldi, D.; Tannahill, D.; Balasubramanian, S. G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1796. [[CrossRef](#)]
12. Long, X.; Stone, M.D. Kinetic Partitioning Modulates Human Telomere DNA G-Quadruplex Structural Polymorphism. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e83420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B.E.; Salazar, M.; Kerwin, S.M.; Trent, J.O.; Jenkins, T.C.; Neidle, S.; Hurley, L.H. Inhibition of human telomerase by a G-Quadruplex-Interactive compound. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113–2116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lee, H.-S.; Carmena, M.; Liskovych, M.; Peat, E.; Kim, J.-H.; Oshimura, M.; Masumoto, H.; Teulade-Fichou, M.-P.; Pommier, Y.; Earnshaw, W.C.; et al. Systematic Analysis of Compounds Specifically Targeting Telomeres and Telomerase for Clinical Implications in Cancer Therapy. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 6282–6296. [[CrossRef](#)]
15. Dickerhoff, J.; Onel, B.; Chen, L.; Chen, Y.; Yang, D. Solution Structure of a MYC Promoter G-Quadruplex with 1:6:1 Loop Length. *ACS Omega* **2019**, *4*, 2533–2539. [[CrossRef](#)]
16. Balasubramanian, S.; Hurley, L.H.; Neidle, S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: A novel anticancer strategy? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 261–275. [[CrossRef](#)]
17. Cimino-Reale, G.; Zaffaroni, N.; Folini, M. Emerging Role of G-quadruplex DNA as Target in Anticancer Therapy. *Curr. Pharm. Design* **2016**, *22*, 6612–6624. [[CrossRef](#)]
18. Asamitsu, S.; Obata, S.; Yu, Z.; Bando, T.; Sugiyama, H. Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands Toward Cancer Therapy. *Molecules* **2019**, *24*, 429. [[CrossRef](#)]
19. Yoshida, W.; Saikyo, H.; Nakabayashi, K.; Yoshioka, H.; Bay, D.H.; Iida, K.; Kawai, T.; Hata, K.; Ikebukuro, K.; Nagasawa, K.; et al. Identification of G-quadruplex clusters by high-throughput sequencing of whole-genome amplified products with a G-quadruplex ligand. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Brázda, V.; Hároníková, L.; Liao, J.C.C.; Fojta, M. DNA and RNA Quadruplex-Binding Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 17493–17517. [[CrossRef](#)]

21. Mishra, S.K.; Tawani, A.; Mishra, A.; Kumar, A. G4IPDB: A database for G-quadruplex structure forming nucleic acid interacting proteins. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Brázda, V.; Cerveň, J.; Bartas, M.; Mikysková, N.; Coufal, J.; Pečinka, P. The amino acid composition of quadruplex binding proteins reveals a shared motif and predicts new potential quadruplex interactors. *Molecules* **2018**, *23*, 2341. [[CrossRef](#)]
23. Patro, L.P.P.; Kumar, A.; Kolimi, N.; Rathinavelan, T. 3D-NuS: A web server for automated modeling and visualization of non-canonical 3-dimensional nucleic acid structures. *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 2438–2448. [[CrossRef](#)]
24. Huppert, J.L.; Balasubramanian, S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2908–2916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Eddy, J.; Maizels, N. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3887–3896. [[CrossRef](#)]
26. Bedrat, A.; Lacroix, L.; Mergny, J.L. Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1746–1759. [[CrossRef](#)]
27. diCenzo, G.C.; Finan, T.M. The Divided Bacterial Genome: Structure, Function, and Evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017**, *81*, e00019-17. [[CrossRef](#)]
28. Yadav, V.K.; Abraham, J.K.; Mani, P.; Kulshrestha, R.; Chowdhury, S. QuadBase: Genome-wide database of G4 DNA—Occurrence and conservation in human, chimpanzee, mouse and rat promoters and 146 microbes. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D381–D385. [[CrossRef](#)]
29. König, S.L.B.; Huppert, J.L.; Sigel, R.K.O.; Evans, A.C. Distance-dependent duplex DNA destabilization proximal to G-quadruplex/i-motif sequences. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 7453–7461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mishra, S.K.; Jain, N.; Shankar, U.; Tawani, A.; Sharma, T.K.; Kumar, A. Characterization of highly conserved G-quadruplex motifs as potential drug targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1791. [[CrossRef](#)]
31. Rawal, P.; Kummarasetti, V.B.R.; Ravindran, J.; Kumar, N.; Halder, K.; Sharma, R.; Mukerji, M.; Das, S.K.; Chowdhury, S. Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: Role in *Escherichia coli* global regulation. *Genome Res.* **2006**, *16*, 644–655. [[CrossRef](#)]
32. Neidle, S. The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 239–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Saranathan, N.; Vivekanandan, P. G-Quadruplexes: More than just a kink in microbial genomes. *Trends Microbiol.* **2018**, *27*, 148–163. [[CrossRef](#)]
34. Kaplan, O.I.; Berber, B.; Hekim, N.; Doluca, O. G-quadruplex prediction in *E. coli* genome reveals a conserved putative G-quadruplex-Hairpin-Duplex switch. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 9083–9095. [[PubMed](#)]
35. Brocchieri, L. The GC Content of Bacterial Genomes. *J. Phylogenet. Evolut. Biol.* **2013**, *2*, 1–3. [[CrossRef](#)]
36. Ding, Y.; Fleming, A.M.; Burrows, C.J. Case studies on potential G-quadruplex-forming sequences from the bacterial orders Deinococcales and Thermales derived from a survey of published genomes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15679. [[CrossRef](#)]
37. Brumm, P.J.; Monsma, S.; Keough, B.; Jasinovica, S.; Ferguson, E.; Schoenfeld, T.; Lodes, M.; Mead, D.A. Complete Genome Sequence of *Thermus aquaticus* Y51MC23. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138674. [[CrossRef](#)]
38. Waller, Z.A.E.; Pinchbeck, B.J.; Buguth, B.S.; Meadows, T.G.; Richardson, D.J.; Gates, A.J. Control of bacterial nitrate assimilation by stabilization of G-quadruplex DNA. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 13511–13514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Čechová, J.; Lýsek, J.; Bartas, M.; Brázda, V. Complex analyses of inverted repeats in mitochondrial genomes revealed their importance and variability. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 1081–1085. [[CrossRef](#)]
40. Brázda, V.; Kolomazník, J.; Lýsek, J.; Hároníková, L.; Coufal, J.; Št'astný, J. Palindrome analyser—A new web-based server for predicting and evaluating inverted repeats in nucleotide sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *478*, 1739–1745. [[CrossRef](#)]
41. Brázda, V.; Lýsek, J.; Bartas, M.; Fojta, M. Complex Analyses of Short Inverted Repeats in All Sequenced Chloroplast DNAs. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1097018. [[CrossRef](#)]
42. Ruggiero, E.; Richter, S.N. G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: Targets and tools in antiviral therapy. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 3270–3283. [[CrossRef](#)]
43. Chen, B.-J.; Wu, Y.-L.; Tanaka, Y.; Zhang, W. Small Molecules Targeting c-Myc Oncogene: Promising Anti-Cancer Therapeutics. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10*, 1084–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Belmonte-Reche, E.; Martínez-García, M.; Guédin, A.; Zuffo, M.; Arévalo-Ruiz, M.; Doria, F.; Campos-Salinas, J.; Maynadier, M.; López-Rubio, J.J.; Freccero, M.; et al. G-Quadruplex Identification in the Genome of Protozoan Parasites Points to Naphthalene Diimide Ligands as New Antiparasitic Agents. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1231–1240. [[CrossRef](#)]
45. Li, F.; Mulyana, Y.; Feterl, M.; Warner, J.M.; Collins, J.G.; Keene, F.R. The antimicrobial activity of inert oligonuclear polypyridylruthenium(II) complexes against pathogenic bacteria, including MRSA. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 5032–5038. [[CrossRef](#)]
46. Li, F.; Grant Collins, J.; Richard Keene, F. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2529–2542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Xu, L.; Chen, X.; Wu, J.; Wang, J.; Ji, L.; Chao, H. Dinuclear Ruthenium(II) Complexes That Induce and Stabilise G-Quadruplex DNA. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 4008–4020. [[CrossRef](#)]
48. Xu, L.; Zhang, D.; Huang, J.; Deng, M.; Zhang, M.; Zhou, X. High fluorescence selectivity and visual detection of G-quadruplex structures by a novel dinuclear ruthenium complex. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 743–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wilson, T.; Williamson, M.P.; Thomas, J.A. Differentiating quadruplexes: Binding preferences of a luminescent dinuclear ruthenium (II) complex with four-stranded DNA structures. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2617–2621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Codd, G.A.; Lindsay, J.; Young, F.M.; Morrison, L.F.; Metcalf, J.S. Harmful cyanobacteria. In *Harmful Cyanobacteria*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2005; pp. 1–23.
51. Perrone, R.; Lavezzo, E.; Riello, E.; Manganelli, R.; Palù, G.; Toppo, S.; Provvedi, R.; Richter, S.N. Mapping and characterization of G-quadruplexes in Mycobacterium tuberculosis gene promoter regions. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lavezzo, E.; Berselli, M.; Frasson, I.; Perrone, R.; Palù, G.; Brazzale, A.R.; Richter, S.N.; Toppo, S. G-quadruplex forming sequences in the genome of all known human viruses: A comprehensive guide. *PLOS Comput. Biol.* **2018**, *14*, e1006675. [[CrossRef](#)]
53. Beaume, N.; Pathak, R.; Yadav, V.K.; Kota, S.; Misra, H.S.; Gautam, H.K.; Chowdhury, S. Genome-wide study predicts promoter-G4 DNA motifs regulate selective functions in bacteria: Radioresistance of D. radiodurans involves G4 DNA-mediated regulation. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 76–89. [[CrossRef](#)]
54. Kota, S.; Dhamodharan, V.; Pradeepkumar, P.I.; Misra, H.S. G-quadruplex forming structural motifs in the genome of Deinococcus radiodurans and their regulatory roles in promoter functions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 9761–9769. [[CrossRef](#)]
55. Repoila, F.; Darfeuille, F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: Physiology and mechanistic aspects. *Biol. Cell* **2009**, *101*, 117–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Brázda, V.; Kolomazník, J.; Lýsek, J.; Bartas, M.; Fojta, M.; Šťastný, J.; Mergny, J.-L. G4Hunter web application: A web server for G-quadruplex prediction. *Bioinformatics* **2019**, btz087. [[CrossRef](#)]
57. Sayers, E.W.; Agarwala, R.; Bolton, E.E.; Brister, J.R.; Canese, K.; Clark, K.; Connor, R.; Fiorini, N.; Funk, K.; Hefferon, T.; et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D23–D28. [[CrossRef](#)]
58. Federhen, S. The NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *40*, D136–D143. [[CrossRef](#)]
59. Letunic, I.; Bork, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W242–W245. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Not available.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Divergent distributions of inverted repeats and G-quadruplex forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*

Michaela Čutová¹, Jacinta Manta¹, Otília Porubiaková¹, Patrik Kaura², Jiří Šťastný^{2,3}, Eva B. Jagelská⁴, Pratik Goswami⁴, Martin Bartas⁵, Václav Brázda^{1,4*}

¹Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

²Brno University of Technology, Faculty of Mechanical Engineering, Technická 2896/2, 616 69 Brno, Czech Republic

³Mendel University in Brno, Zemědělská 1665/1, 61300 Brno, Czech Republic

⁴Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

⁵Department of Biology and Ecology/Institute of Environmental Technologies, Faculty of Science, University of Ostrava, Ostrava, 710 00, Czech Republic

*Correspondence to:

Václav Brázda, Ph.D.

e-mail: vaclav@ibp.cz

Keywords: inverted repeat; G-quadruplex; *Saccharomyces cerevisiae*

Highlights:

- IRs and G-quadruplex (G4) forming sequences were quantified in the *S. cerevisiae* nuclear and mitochondrial genome
- Sequences were analysed by Palindrome Analyser and G4Hunter tools
- Both IRs and G4s show non-random localizations within the nuclear and mitochondrial sequences
- IRs are most enriched in centromeres and rDNA/rRNA regions. G4s are particularly enriched in telomeres and surrounding tRNAs.

Abstract

The importance of DNA structure in the regulation of basic cellular processes is an emerging field of research. Amongst local non-B DNA structures, inverted repeat (IR) sequences that form cruciforms and G-rich sequences that form G-quadruplexes (G4) are found in many/all prokaryotic and eukaryotic organisms and are targets for regulatory proteins. In this paper, we analyzed IRs and G4 sequences in the nuclear and mitochondrial genomes of the most important biotechnology microorganism, *S. cerevisiae*, which is a simple and effective model organism for understanding cellular and molecular processes in eukaryotes. IR and G4-prone sequences are enriched in specific locations in the genome and differ markedly between mitochondrial and nuclear DNA. While G4s are overrepresented in telomeres and regions surrounding tRNAs, IRs are most enriched in centromeres, rDNA and replication origins, but are also enriched surrounding tRNAs. Mitochondrial DNA is enriched in both IR and G4-prone sequences relative to the nuclear genome. This extensive analysis of local DNA structures adds to the emerging picture of their importance in genome maintenance, DNA replication and transcription of subset of genes.

Introduction

DNA primarily exists as a double helix [1]. However, it has been demonstrated that DNA can form local non-B DNA structures including cruciforms [2], triplexes [3] and G-quadruplexes (G4s) [4], which regulate important biological processes [5] including transcriptional activation, telomere maintenance and immune response [6]. Formation of these structures is induced by negative supercoiling of DNA, which induces local nucleotide sequence-dependent conformational changes [7], and/or by protein binding [8]. The genomes and transcriptomes of various organisms, including model organisms *E. coli* [9] and *S. cerevisiae* [10], and of humans cells [11], contain numerous inverted repeats (IRs) and G-rich sequences. Local DNA structures are formed in the presence of sequence motifs, among the most studied structures are cruciforms (Figure 1A) that can form from an IR, and G4s that form in G-rich sequences where guanines are presented in specific G-tracts (Figure 1B). The formation of cruciforms is mainly dependent on base sequence and requires perfect or imperfect IRs of 6 or more nucleotides [12,13]. IRs involved in regulatory functions have been evolutionarily conserved, on the other hand, long IRs could be a source of genetic instability [14,15]. Importantly, IRs are often found in close vicinity to polyadenylation (poly(A)) sites [16], replication sites and transcription start sites [2]. G4s are stabilized by potassium or sodium ions and can assume various conformations involving one, two or four DNA molecules [17,18]. G4 sequences are found in telomeres, promoters and other biologically important regions of mammalian genomes [19,20] and are formed by G:G Hoogsteen base pairing [21]. Clusters of G4-forming sequences induce gene expression and are found in regulatory regions of oncogenes [22]. Knowledge of IR and potential quadruplex-forming sequences (PQS) is therefore important for understanding their roles in DNA maintenance and regulation.

Previous studies have shown significant enrichment of IRs in the *S. cerevisiae* genome by IRFinder [23], as well as enrichment of PQS and their functional relevance with transcription [10]. The importance of these local DNA structures is supported also by observations that several *S. cerevisiae* proteins such as Rap1p, Hop1p, Mre11p and Sep1p interact with G4s [24], in agreement with recent studies showing the importance of G4-binding proteins in humans [25–27]. *S. cerevisiae*, as a model eukaryotic organism, offers several genetic systems that facilitate exploration of the *in vivo* functions of local DNA structures. For example, the 3' ends of most eukaryotic telomeres terminate in a G-rich single stranded overhang with high G4-forming potential [28] and the telomere repeat DNA in *S. cerevisiae* is formed by the consensus sequence 5'-[(TG)₀₋₆TGGGTGTG(G)]_n-3' [29], which has been shown to form a G4 structure [30]. In addition to telomeres, numerous sequences have the potential to form intramolecular G4s. For examples, promoter regions [31], ribosomal DNA [32], minisatellites [33] and the immunoglobulin (Ig) heavy chain genes [34]. Knowledge of the presence and localization of local DNA structures in *S. cerevisiae* is therefore important for their effective usage as a tool for functional studies.

Here, we analyzed for the first time differences in IR and PQS localization in the *S. cerevisiae* nuclear and mitochondrial genomes using the new tools Palindrome analyser and G4Hunter web server. Our results show the presence, frequency and localization of these sequence motifs and their dissimilar localizations, suggesting their distinct functional roles in the genome.

Results

The fully sequenced genome of *S. cerevisiae* in the NCBI database consists of 16 chromosomes and one mtDNA. *S. cerevisiae* chromosomes vary from 230 kbp for chromosome I to 1.53 Mbp for chromosome IV and mtDNA is 85.78 kbp in length (NCBI IDs are provided in Supplementary material 1).

Analysis of IRs

We analyzed the *S. cerevisiae* genome for the presence of IRs of length 10-30, spacer size 0–10 bp and 0 or 1 mismatch. In total, we identified 8951 IRs in 12157105 bp (overall IR frequency = 0.74 IR/kbp). The overall number of IRs and the longest IR found in each chromosome and mtDNA of *S. cerevisiae* are shown in Table 1. While the frequency of IRs in chromosomal DNA varied from 0.42 to 0.83 IRs per kbp (mean = 0.56 IR/kbp), the frequency of IRs in mtDNA is 45-times higher at 25.02 IR/kbp. Shapiro-Wilk test of IR frequencies in chromosomal DNAs shows that these data are not normally distributed: $W = 0.86912$, $p\text{-value} = 0.02637$, and Wilcoxon signed rank test indicates that IR frequencies in chromosomal DNA are significantly different ($p = 0.0004793$). A graphical representation of IR frequencies is shown in Figure 2.

Table 1: IR characteristics in chromosomes and mtDNA

DNA sequence	Size (bp)	Number of IRs	Frequency (IR/kbp)	Longest IR (bp)
Chr I	230218	96	0.42	16
Chr II	813184	476	0.59	23
Chr III	316620	262	0.83	29
Chr IV	1531933	866	0.57	23
Chr V	576874	337	0.58	19
Chr VI	270161	172	0.64	16
Chr VII	1090940	662	0.61	21
Chr VIII	562643	321	0.57	19
Chr IX	439888	253	0.58	18
Chr X	745751	392	0.53	20
Chr XI	666816	414	0.62	20
Chr XII	1078177	602	0.56	24
Chr XIII	924431	448	0.48	18
Chr XIV	784333	418	0.53	22
Chr XV	1091291	605	0.55	20
Chr XVI	948066	481	0.51	20
Total nuclear	12071326	6805	0.56	29
mtDNA	85779	2146	25.02	23

We also compared IR frequencies according to length (Table 2). IRs with the shortest length (10 bp) are the most abundant and their numbers and frequencies decrease with increasing IR length. While all chromosomes and mtDNA have at least

one IR of length 16 bp, longer IRs were rare and individual IRs with length 19 bp or more represent less than 10% of all IRs. Although the IR frequency is higher in mtDNA, longer IRs are present in chromosome XII (24 bp) and chromosome II (29 bp long).

Table 2: Numbers and frequencies of IRs according to size

IR size	Number in data set	IR/kbp	IR size	Number in data set	IR/kbp
10	4610	0.3792	21	14	0.0012
11	2017	0.1659	22	10	0.0008
13	947	0.0779	23	4	0.0003
14	540	0.0444	24	1	0.0001
15	321	0.0264	25	0	0
16	187	0.0154	26	1	0.0001
17	73	0.0060	27	0	0
18	59	0.0049	28	0	0
19	35	0.0029	29	1	0.0001
20	27	0.0022	30	0	0

The majority of IRs are without any spacer, followed by IRs with 1 bp between repeats (more than 3-fold less frequent for 1 bp spacer). Interestingly, mtDNA has a relatively high frequency of IRs with 1bp spacer (only 2-fold less frequent than IRs without spacer). The third most often spacer in chromosomal DNA is 3, whereas the third most often spacer is 5 bp in mtDNA (all data for spacers are in Supplementary material 2). The total number of IRs without any mismatch is 876, the remaining 8602 IRs contain one mismatch in the sequence. Numbers and frequencies for all analyzed lengths, spacers, mismatches and their statistical comparisons are detailed in Supplementary material 2.

PQS analysis

We analyzed *S. cerevisiae* DNA sequences for PQS by G4Hunter. G4Hunter results are presented as “individual G4Hunter score” (for exact size of the analyses – in our case 25bp long window) and as “grouped G4Hunter score” (for sequences with G4Hunter above the defined score of 1.2 – which includes all 25 bp long individual sequences grouped to one long sequence). PQS is usually associated with

high GC content and *S. cerevisiae* DNA has a low GC content, varying from 37.9% to 39.3% in chromosomes and only 17.1% in mtDNA. Using standard values or G4Hunter - window size 25 and G4Hunter score above 1.2 - we identified a total of 3768 grouped PQS in *S. cerevisiae* DNA. Surprisingly, given that mtDNA has the lowest GC content, mtDNA showed the highest frequency of PQS. The overall number of PQS (score 1.2 or above), the highest G4Hunter scores, GC content and length of all PQS (all base pairs with potential to form G4) divided by total number of bp in the DNA (%PQS) for each chromosome and mtDNA of *S. cerevisiae* are shown in Table 3. Detailed results (Threshold 1.2) are provided in Supplementary Material 3.

Table 3: Numbers of PQS, highest G4Hunter score, GC content and %PQS in chromosome/mtDNA. Analysis conditions: Window 25, Threshold 1.2, grouped G4Hunter score.

DNA sequence	Number of PQS	Highest G4Hunter score	%GC content	%PQS
Chr I	87	1.38	39	1.16%
Chr II	248	1.37	38	0.90%
Chr III	138	1.37	39	1.34%
Chr IV	429	1.54	38	0.85%
Chr V	197	1.44	39	1.03%
Chr VI	86	1.38	39	1.03%
Chr VII	334	1.59	38	0.89%
Chr VIII	157	1.37	38	0.88%
Chr IX	162	1.42	39	1.11%
Chr X	192	1.61	38	0.77%
Chr XI	214	1.41	38	0.96%
Chr XII	347	1.47	39	0.97%
Chr XIII	258	1.45	38	0.94%
Chr XIV	256	1.32	39	1.01%
Chr XV	314	1.56	38	0.86%
Chr XVI	306	1.41	38	0.96%
Total nuclear	3725	1.44	39	0.94%
mtDNA	43	1.37	17	1.65%

A graphical representation of PQS frequencies is shown in Figure 3. Using Wilcoxon signed rank test, the frequencies of PQSs in chromosomal DNA are significantly different ($p = 0.00003052$). Considering the very low GC content in mtDNA [35], the highest frequency of PSQ in mtDNA points to specific organization of GC-rich regions in specific G-prone sites. Higher G4Hunter scores indicate a higher probability of a G4 forming inside the PQS [40,41]. We therefore also analyzed the sequences using various values (G4Hunter score from 1.2 to 2) and fixed window size 25, a summary of these data is shown in Table 4.

Table 4: PQS numbers and frequencies per kbp in *S.cerevisiae* based on G4 hunter score (grouped PQS).

G4Hunter threshold	Number of PQS	PQS frequency (/kbp)
1.2-1.4	2490	0.21
1.4-1.6	865	0.073
1.6-1.8	260	0.022
1.8-2.0	91	0.0077
2.0-more	62	0.0052

IR frequencies according to sequence annotations

The NCBI genome database contains chromosome and mtDNA annotations. The best described are gene (9026186), mRNA (8587452), repeat region (111937), replication origin (107618), tRNA (19630), ncRNA (33448), centromere (3702), mobile_element (291801), telomere (140679), sequence-tagged site (STS) (7297), rRNA (15327), misc_feature (12429) and misc_RNA (16714). To compare IR frequencies at different locations we used the most common annotation “gene” as a standard for comparison with others. The frequency of IRs in centromeric regions is 27-fold higher than IRs located in gene regions. IRs are also abundant in and before rRNA and inside STS locations (more than 10-times more abundant than genes), in replication origins, and before rRNA and centromere regions. IRs are relatively less frequent inside tRNA regions and more abundant before and after tRNA regions. The ratios of IR frequencies in annotated features are shown in Figure 4A. All data of frequencies and ratios for IRs in various regions are provided in Supplementary material 4.

PQS frequencies according to sequence annotations

The ratio of PQS frequencies in different annotated features are shown in Figure 4B. The highest occurrence of PQS within features was observed in telomere sequences (more than 8-times more often than in gene regions), followed by rRNA and misc_feature. PQS are abundant also within rRNA (3.8-times higher compared to gene regions) and replication origins (1.4-fold higher). We also found high levels of PQS before and after features, most notably tRNA regions; even though PQS inside the tRNA region is 5-times lower than genes, PQS are greater than 20-times more abundant 100bp before and after tRNA regions. Similarly, there is an abundance before and after rRNA regions (9.6-fold higher before and 14.7-fold higher after this feature), and before and after STS, replication origins and repeat regions (Figure 4B, Supplementary material 4).

Discussion

The importance of local DNA structures for DNA maintenance and regulation has emerged in the last decade. It has been demonstrated that IRs able to form cruciforms play important roles in transcription regulation by interaction with many proteins [2] including, for example, the p53 human tumor suppressor protein [36]. Contemporary bioinformatics tools allow analyses of complete genomes, which brings a more complete view of DNA structure and regulation [37,38]. Analyses of mitochondrial and plastid DNAs of all sequenced organisms has shown the presence of IRs in replication origins and other regulatory regions [39,40]. A previous study using a different algorithm (Inverted Repeat Finder) and with different parameters, demonstrated that *S. cerevisiae* chromosomal IRs are clustered in intergenic regions [23]. Here, using Palindrome analyser applied to nuclear and mtDNA, we show that short IRs are more abundant in *S. cerevisiae* mtDNA than chromosomal DNA and that the majority of IRs are located in centromeric region of chromosomal DNA. The relative abundance in replication origins suggest that IRs

play an important role not only in viral and bacterial replication [41,42], but also in controlling eukaryotic replication.

In addition to IRs, we also investigated PQS. Several proteins have been described to interact with G4s in *S. cerevisiae* [24], including helicases that play important roles in genome maintenance during replication, for example Sgs1p [43,44]. Other G4-binding proteins are proposed to have roles in telomere capping, such as Cdc13p [45], or telomere length regulation and transcriptional silencing/activation, such as Rap1p [46]. Here, we demonstrated that PQS are highly abundant in telomere regions and, moreover, in close proximity to several important regulatory regions. The presence of PQS in these regions suggests their crucial function in *S. cerevisiae* genome regulation. Interestingly, we show that both IRs and PQS are not randomly located, but are enriched in specific chromosomes and specific locations of the *S. cerevisiae* nuclear and mitochondrial genomes. These results point to distinct functional usages of IRs and G4s. The differences in frequencies of local DNA structures in mitochondrial and chromosomal DNA suggest that regulation of DNA expression is different in circular and linear DNAs.

Methods

Genome sequences and bioinformatic analyses

The complete DNA sequence of the *S. cerevisiae* S288C nuclear and mitochondrial genomes were downloaded (May 20, 2019) in FASTA format from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) [47]. The genomes were analyzed by Palindrome analyser [38] and G4Hunter web [48] for the presence and localization of IRs and PQS, respectively. For IR analyses, the parameters were; size of IR 10 to 30 bp; spacer size 0 to 10 bp; one mismatch was allowed. We produced a separate list of IRs found in each chromosome and mtDNA sequences. PQS analyses used parameters of “25” for window and G4Hunter score above 1.2.

Analysis of IRs and PQS around annotated NCBI features

We also downloaded tables containing feature annotations from NCBI (e.g. transcription start sites, polyA sites, centromere, telomere, *etc.* These data were used to investigate the occurrence of IRs of various lengths and of PQS before

and after (± 100 bp) and inside features. Further processing was performed in Microsoft Excel.

Statistical evaluation

Statistical evaluations of normality were made by Shapiro-Wilk test. Because data do not have normal distributions, we additionally analyzed our data by Wilcoxon signed rank test (with p-value cut-off 0.05). For statistical evaluation of outliers, `chisq.out.test` (from R package "outliers") was used.

Acknowledgments

We thank Dr. Philip Coates for proofreading and editing the manuscript. This work was supported by The Czech Science Foundation (18-15548S).

References

- [1] J.D. Watson, F.H.C. Crick
A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid
Nature, 171 (1953), pp. 737–738
- [2] V. Brázda, R.C. Laister, E.B. Jagelská, C. Arrowsmith
Cruciform structures are a common DNA feature important for regulating biological processes
BMC Mol. Biol., 12 (2011), 33
- [3] L.D. Nelson, C. Bender, H. Mannsperger, D. Buergy, P. Kambakamba, G. Mudduluru, U. Korf, D. Hughes, M.W. Van Dyke, H. Allgayer
Triplex DNA-binding proteins are associated with clinical outcomes revealed by proteomic measurements in patients with colorectal cancer
Mol. Cancer, 11 (2012), 38.
- [4] Z.-Y. Sun, X.-N. Wang, S.-Q. Cheng, X.-X. Su, T.-M. Ou
Developing Novel G-Quadruplex Ligands: From Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid–Protein Interaction
Molecules, 24 (2019)
- [5] A. Siddiqui-Jain, C.L. Grand, D.J. Bearss, L.H. Hurley
Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription
Proc. Natl. Acad. Sci., 99 (2002), pp. 11593–11598
- [6] J. Zhao, A. Bacolla, G. Wang, K.M. Vasquez
Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution
Cell. Mol. Life Sci., 67 (2010), pp. 43–62
- [7] E. Palecek
Local supercoil-stabilized DNA structures
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 26 (1991), pp. 151–226

- [8] V. Brázda, J. Coufal
Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein
Int. J. Mol. Sci., 18 (2017), pii: E375.
- [9] P. Rawal, V.B.R. Kummarasetti, J. Ravindran, N. Kumar, K. Halder, R. Sharma, M. Mukerji, S.K. Das, S. Chowdhury
Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: Role in Escherichia coli global regulation
Genome Res., 16 (2006), pp. 644–655
- [10] S.G. Hershman, Q. Chen, J.Y. Lee, M.L. Kozak, P. Yue, L.-S. Wang, F.B. Johnson
Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in Saccharomyces cerevisiae
Nucleic Acids Res., 36 (2008), pp. 144–156
- [11] J.L. Huppert, S. Balasubramanian
Prevalence of quadruplexes in the human genome
Nucleic Acids Res., 33 (2005), pp. 2908–2916
- [12] A.L. Mikheikin, A.Y. Lushnikov, Y.L. Lyubchenko
The Effect of DNA Supercoiling on Geometry of Holliday Junctions
Biochemistry, 45 (2006), pp. 12998–13006
- [13] O.I. Limanskaia, A.P. Limanskiĭ
Distribution of potentially hairpin-loop structures in the genome of bovine retroviruses
Vopr. Virusol., 54 (2009), pp. 27–32
- [14] E.A. Wojcik, A. Brzostek, A. Bacolla, P. Mackiewicz, K.M. Vasquez, M. Korycka-Machala, A. Jaworski, J. Dziadek
Direct and Inverted Repeats Elicit Genetic Instability by Both Exploiting and Eluding DNA Double-Strand Break Repair Systems in Mycobacteria
PLoS One, 7 (2012), e51064
- [15] S. Lu, G. Wang, A. Bacolla, J. Zhao, S. Spitser, K.M. Vasquez
Short Inverted Repeats Are Hot Spots For Genetic Instability: Relevance to Cancer Genomes
Cell Rep., 10 (2015), pp. 1674–1680
- [16] O. Miura, T. Ogake, H. Yoneyama, Y. Kikuchi, T. Ohyama
A strong structural correlation between short inverted repeat sequences and the polyadenylation signal in yeast and nucleosome exclusion by these inverted repeats
Curr Genet., 65 (2019), pp. 575–590
- [17] M. Vorlíčková, I. Kejnovská, J. Sagi, D. Renčiuk, K. Bednářová, J. Motlová, J. Kypr
Circular dichroism and guanine quadruplexes
Methods, 57 (2012), pp. 64–75
- [18] V. Tokan, J. Puterova, M. Lexa, E. Kejnovsky
Quadruplex DNA in long terminal repeats in maize LTR retrotransposons inhibits the expression of a reporter gene in yeast
BMC Genomics, 19 (2018), pp. 184
- [19] M. Bartas, V. Brázda, V. Karlický, J. Červeň, P. Pečinka
Bioinformatics analyses and in vitro evidence for five and six stacked G-quadruplex forming sequences
Biochimie, 150 (2018), pp. 70–75
- [20] O. Kikin, L. D'Antonio, P.S. Bagga
QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences
Nucleic Acids Res., 34 (2006), pp. W676–W682

- [21] R.W. Harkness, A.K. Mittermaier
G-quadruplex dynamics
BBA - Proteins and Proteomics, 1865 (2017), pp. 1544–1554
- [22] W. Yoshida, H. Saikyo, K. Nakabayashi, H. Yoshioka, D.H. Bay, K. Iida, T. Kawai, K. Hata, K. Ikebukuro, K. Nagasawa, I. Karube
Identification of G-quadruplex clusters by high-throughput sequencing of whole-genome amplified products with a G-quadruplex ligand
Sci. Rep., 8 (2018), pp. 1–8
- [23] E.M. Strawbridge, G. Benson, Y. Gelfand, C.J. Benham
The distribution of inverted repeat sequences in the *Saccharomyces cerevisiae* genome
Curr. Genet., 56 (2010), pp. 321–340
- [24] J.E. Johnson, J.S. Smith, M.L. Kozak, F.B. Johnson
In vivo veritas: using yeast to probe the biological functions of G-quadruplexes
Biochimie, 90 (2008), pp. 1250–1263
- [25] V. Brázda, L. Hároníková, J.C.C. Liao, M. Fojta
DNA and RNA Quadruplex-Binding Proteins
Int. J. Mol. Sci., 15 (2014), pp. 17493–17517
- [26] S.K. Mishra, A. Tawani, A. Mishra, A. Kumar
G4IPDB: A database for G-quadruplex structure forming nucleic acid interacting proteins
Sci Rep., 6 (2016), 38144
- [27] V. Brázda, J. Červeň, M. Bartas, N. Mikysková, J. Coufal, P. Pečinka
The Amino Acid Composition of Quadruplex Binding Proteins Reveals a Shared Motif and Predicts New Potential Quadruplex Interactors
Molecules, 23 (2018), pii: E2341
- [28] C. Schaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H.J. Lipps, A. Plückthun
In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei
Proc. Natl. Acad. Sci., 98 (2001), pp. 8572–8577
- [29] K. Förstemann, J. Lingner
Molecular basis for telomere repeat divergence in budding yeast
Mol. Cell. Biol., 21 (2001), pp. 7277–7286
- [30] P.K. Patel, R.V. Hosur
NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats
Nucleic Acids Res., 27 (1999), pp. 2457–2464
- [31] M.L. Duquette, P. Handa, J.A. Vincent, A.F. Taylor, N. Maizels
Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA
Genes Dev., 18 (2004), pp. 1618–1629
- [32] L.A. Hanakahi, H. Sun, N. Maizels
High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA
J. Biol. Chem., 274 (1999), pp. 15908–15912
- [33] G.N. Parkinson, M.P.H. Lee, S. Neidle
Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA
Nature, 417 (2002), pp. 876–880
- [34] M.N. Weitzmann, K.J. Woodford, K. Usdin
DNA secondary structures and the evolution of hypervariable tandem arrays
J. Biol. Chem., 272 (1997), pp. 9517–9523
- [35] J.A. Capra, K. Paeschke, M. Singh, V.A. Zakian
G-quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with

- distinct genomic features in *Saccharomyces cerevisiae***
 PLoS Comput. Biol., 6 (2010), e1000861
- [36] V. Brázda, J. Čechová, M. Battistin, J. Coufal, E.B. Jagelská, I. Raimondi, A. Inga
The structure formed by inverted repeats in p53 response elements determines the transactivation activity of p53 protein
 Biochem. Biophys. Res. Commun., 483 (2017), pp. 516–521
- [37] A. Bedrat, L. Lacroix, J.-L. Mergny
Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter
 Nucleic Acids Res., 44 (2016), pp. 1746–1759
- [38] V. Brázda, J. Kolomazník, J. Lýsek, L. Hároníková, J. Coufal, J. Št'astný
Palindrome analyser – A new web-based server for predicting and evaluating inverted repeats in nucleotide sequences
 Biochem. Biophys. Res. Commun., 478 (2016), pp. 1739–1745
- [39] J. Čechová, J. Lýsek, M. Bartas, V. Brázda
Complex analyses of inverted repeats in mitochondrial genomes revealed their importance and variability
 Bioinformatics, 34 (2018), pp. 1081–1085
- [40] V. Brázda, J. Lýsek, M. Bartas, M. Fojta
Complex Analyses of Short Inverted Repeats in All Sequenced Chloroplast DNAs
 BioMed Res. Int., 2018 (2018),
- [41] S. Chodavarapu, J.M. Kaguni
Replication Initiation in Bacteria
 Enzymes, 39 (2016), pp. 1–30
- [42] W. Fuchs, C. Ehrlich, B.G. Klupp, T.C. Mettenleiter
Characterization of the replication origin (Ori(S)) and adjoining parts of the inverted repeat sequences of the pseudorabies virus genome
 J. Gen. Virol., 81 (2000), pp. 1539–1543
- [43] H. Sun, R.J. Bennett, N. Maizels
The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs
 Nucleic Acids Res., 27 (1999), pp. 1978–1984
- [44] M.D. Huber, M.L. Duquette, J.C. Shiels, N. Maizels
A conserved G4 DNA binding domain in RecQ family helicases
 J. Mol. Biol., 358 (2006), pp. 1071–1080
- [45] Y.C. Lin, J.W. Shih, C.L. Hsu, J.J. Lin
Binding and partial denaturing of G-quartet DNA by Cdc13p of *Saccharomyces cerevisiae*
 J. Biol. Chem., 276 (2001), pp. 47671–47674
- [46] R. Giraldo, D. Rhodes
The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA
 EMBO J., 13 (1994), pp. 2411–2420
- [47] E.W. Sayers, R. Agarwala, E.E. Bolton, J.R. Brister, K. Canese, K. Clark, R. Connor, N. Fiorini, K. Funk, T. Hefferon, J.B. Holmes, S. Kim, A. Kimchi, P.A. Kitts, S. Lathrop, Z. Lu, T.L. Madden, A. Marchler-Bauer, L. Phan, V.A. Schneider, C.L. Schoch, K.D. Pruitt, J. Ostell
Database resources of the National Center for Biotechnology Information
 Nucleic Acids Res., 47 (2019), D23–D28
- [48] V. Brázda, J. Kolomazník, J. Lýsek, M. Bartas, M. Fojta, J. Št'astný, J.-L. Mergny
G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction
 Bioinformatics, (2019), doi:10.1093/bioinformatics/btz087

Figure legends

Figure 1: Schemes of local DNA structures (A) cruciform (B) G-quadruplex

Figure 2: IR frequencies in chromosomes and mtDNA, Outliers: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3: PQS frequencies in chromosomes and mtDNA, Outliers - see Figure 2.

Figure 4: (A) Differences in IR frequency by DNA locus. The chart shows IR frequencies relative to their frequency in “gene” locations. We analyzed frequencies of IRs with lengths 10 bp and longer within annotated locations (inside) and 100bp before or after annotated locations.

(B) Differences in PQS frequency by DNA locus. The chart shows PQS frequencies relative to the frequency in “gene locations. We analyzed frequencies of all PQS within annotated locations (inside) and 100bp before or after annotated locations.

Appendix: Supplementary materials

Supplementary material 1: NCBI IDs

Supplementary material 2: Statistical values for IRs

Supplementary material 3: Overall results of PQS (threshold 1.2)

Supplementary material 4: Detailed results of IR and PQS in relation to defined genomic features